

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Clarissa Germano Barp

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO DE 7-NITROINDAZOL PARA INIBIÇÃO DA
PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Florianópolis
2016

Clarissa Germano Barp

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO DE 7-NITROINDAZOL PARA INIBIÇÃO DA
PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestra em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Elenara
Lemos Senna

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barp, Clarissa
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO DE 7
NITROINDAZOL PARA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO /
Clarissa Barp ; orientador, Jamil Assreuy ;
coorientadora, Elenara Lemos Senna. - Florianópolis, SC,
2016.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Óxido Nítrico. 4.
Sepse. 5. Nanoemulsão. I. Assreuy, Jamil. II. Lemos Senna,
Elenara. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Clarissa Germano Barp

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO DE 7-NITROINDAZOL PARA INIBIÇÃO DA
PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestra em Farmacologia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jamil Assreuy
(UFSC)
Orientador

Profª. Drª. Cristiana Lima Dora (FURG)

Profª. Drª. Helena Iturvides Cimarosti
(UFSC)

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
(UFSC)

Dedico este trabalho aos meus pais, em forma de gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus/universo por me proporcionar boas oportunidades e pessoas especiais nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela orientação e por ser um incentivador de crescimento profissional e pessoal. Agradeço pela oportunidade, pelos tantos ensinamentos e pela boa convivência.

Aos meus pais, Marlene Germano Barp e Vicente Barp, por todo o amor e pelo incentivo desde os primeiros passos na vida escolar. Obrigada por me guiarem sempre no caminho do bem.

À minha irmã, Camila Germano Barp, com quem compartilhei a infância e crescimento, e hoje compartilho ideias e planos.

Ao Gru, meu companheiro felino, que é dose diária de amor: “Antes de ter amado um animal, parte da nossa alma permanece desacordada”, Anatole France.

A toda a família que, cada um ao seu modo, me incentivam e estão comigo em todas as etapas da vida.

À Prof^a. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos-Senna, pela coorientação e por partilhar seus conhecimentos sobre essa tão interessante área de estudo, a Nanotecnologia.

Ao Professor Dr. José Eduardo da Silva Santos, por me coorientar nos primeiros passos do desenvolvimento deste projeto e por disponibilizar equipamentos importantes para a realização deste trabalho.

À Patrícia de Oliveira Benedet pela ajuda na técnica cirúrgica do CLP e de medida de pressão arterial. Obrigada pela parceria e ensinamentos astrológicos (risos).

À Verônica Vargas Horewicz, pelos inúmeros auxílios nos experimentos com cultura celular e pneumosepse e pela boa convivência.

À Adriane Madeira pelo auxílio técnico, carinho, alegria e café de todos os dias.

Às meninas do NOLab, Karin, Muryel, Dani e Thiele por todo o auxílio.

À Cassiana Mendes, pela colaboração na validação de método cromatográfico. Mas principalmente, por me abrigar nos meus primeiros dias em Florianópolis e por toda a amizade e companheirismo construídos a partir daí. Volte logo, tu me manques.

Às amigas que a Farmacologia me deu, Daiana e Débora, pela amizade e cumplicidade que criamos. Obrigada farmaco team!

À Janaina Kieling Fröhlich, pelo auxílio no desenvolvimento e caracterização das nanoemulsões e por ser tão querida e disposta a ajudar. Aos demais 'nanocolegas' do Laboratório de Farmacotécnica pela cooperação e descontração na bancada.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva por disponibilizar seu laboratório para a validação de método cromatográfico. Também, ao PPG Farmácia por disponibilizar equipamentos importantes no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, Dra. Helena Iturvides Cimarosti, Dra. Cristiana Lima Dora, Dr. Rui Daniel Schroder Prediger e à Dra. Gecioni Loch Neckel por aceitarem o convite de avaliar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Farina por disponibilizar a incubadora de células e à Prof^a. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro pela poli-L-lisina.

À Cristiane Mochny por ensinar a coleta de cerebelo.

Aos professores do PPG Farmacologia pelos ensinamentos.

Aos colegas do PPG Farmacologia pela troca de ideias e cooperação.

Aos funcionários do LAMEB I e II, pelo auxílio no uso dos equipamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

Aos animais que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

“It is in our nature to explore, to reach out into the unknown. The only true failure would be not to explore at all.”

Ernest Shackleton

RESUMO

A participação do óxido nítrico (NO) proveniente da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (NOS-1) tem sido reconhecida como um fator importante em diversas doenças, como a sepse. A inibição de alta seletividade *in vivo* dessa isoforma pelo 7-nitroindazol (7-NI) melhora parâmetros como mortalidade e reatividade vascular na sepse. Porém este composto possui curto tempo de meia vida plasmático (~2 h), limitando seu uso. Com o objetivo de melhor evidenciar o papel da NOS-1 em condições patológicas, desenvolvemos uma formulação de nanoemulsão de óleo de rícino contendo 7-NI e, então, a caracterizamos pelos aspectos de tamanho, índice de polidispersão, teor e eficiência de encapsulação. Uma metodologia analítica para a detecção do composto na nanoemulsão foi desenvolvida e validada. Também, investigamos a estabilidade térmica e à luz no armazenamento durante 30 dias. O estudo de estabilidade mostrou que sistema de nanoemulsões de 7-NI é fotossensível, sendo mais estáveis quando mantidas a 25°C, na ausência de luz. Avaliamos a produção de NO de maneira indireta pela mensuração de nitrito em cultura de células, 48 horas após a inibição com 7-NI livre ou nanoemulsionado. A nanoemulsão de 7-NI reduziu a produção de NO pela NOS-1 de maneira prolongada em células de músculo liso A7r5. Não houve inibição pelo 7-NI livre. Nem o composto livre e nem a nanoemulsão de 7-NI apresentaram citotoxicidade. A nanoemulsão e o composto livre mostraram o mesmo perfil dose-resposta de inibição da produção de NO proveniente da NOS-1 de maneira direta, através da intensidade de fluorescência da sonda DAF-FM DA, seletiva para o NO. Por fim, testamos os efeitos do pré-tratamento com a nanoemulsão de 7-NI em ratos sépticos pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e em camundongos com sepse por pneumonia. A nanoemulsão de 7-NI preveniu em 40% a mortalidade nos dois modelos, enquanto que o 7-NI livre preveniu na mesma proporção apenas no modelo de sepse por CLP. Nossos resultados mostram que nanoemulsões melhoram o tempo de ação do 7-NI, podendo ser ferramenta interessante para o estudo

de doenças que envolvam o desequilíbrio da produção de NO pela NOS-1.

Palavras-chave: 7-nitroindazol, nanoemulsão, óxido nítrico sintase neuronal.

ABSTRACT

The role of nitric oxide (NO) derived from the neuronal isoform of NO synthase (NOS-1) has been recognized as an important factor in several conditions such as sepsis. The inhibition of this isoform by a highly selective in vivo compound 7-nitroindazol (7-NI) improves parameters such as mortality and vascular reactivity in sepsis. However, 7-NI has a very short plasma half-life (~ 2 h), limiting its use. In order to provide a tool for better characterization of the role of NOS-1 in pathological conditions, we developed a formulation of castor oil nanoemulsion containing 7-NI and, then, characterized it by size, polydispersion index, content and encapsulation efficiency. An analytical method for detecting the compound in the nanoemulsion has been developed and validated. Also, we investigated the thermal and light stability for 30 days. The stability study showed that the system with the nanoemulsions of 7-NI is photosensitive, being more stable when maintained at 25°C in the absence of light. NO production was assessed indirectly by measuring nitrite in cell culture 48 hours after inhibition with free or nanoemulsion 7-NI. The nanoemulsion reduced NO production by NOS-1 in a long-lasting manner in A7r5 smooth muscle cells. NO inhibitory effect was induced by free 7-NI. Neither the free compound or the nanoemulsion and 7-NI showed cytotoxicity. The nanoemulsion and free compound showed the same profile of dose-response inhibition of NO production measured by the fluorescence intensity of DAF-FM probe, selective to NO. Finally, we tested the effects of pretreatment with the nanoemulsion 7-NI in septic rats by cecal ligation and puncture model (CLP) and in mice rendered septic by pneumonia. The nanoemulsion reduced the mortality by 40% mortality in both models, whereas the free 7-NI reduced it by the same amount only in the CLP model. Our results show that nanoemulsions extend the effective time of 7-NI, which may be an interesting tool to study diseases involving the imbalance of NO production by NOS-1.

Key-words: 7-nitroindazole, nanoemulsion, neuronal nitric oxide synthase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura das NOS e mecanismo de formação do NO.....	31
Figura 2	Localização da NOS-1 na sinapse (A), no músculo esquelético (B) e cardiomiócitos (C).....	33
Figura 3	Escala de tamanho.....	37
Figura 4	Linha do tempo da nanotecnologia no carregamento de fármacos.....	38
Figura 5	Representação da estrutura da nanoemulsão óleo/água.....	40
Figura 6	A) Estrutura molecular do grupamento indazol. B) Estrutura do 7-nitroindazol.....	45
Figura 7	Cromatogramas do 7-NI e dos demais componentes da amostra, analisados nas mesmas condições.....	56
Figura 8	Representação gráfica da curva de calibração média do 7-NI obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação.....	57
Figura 9	Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade das NE 7-NI frente a temperatura (4° e 25°) e a luz UV ao longo de 30 dias.....	61
Figura 10	Cinética de degradação 7-NI contido na nanoemulsão.....	62
Figura 11	Aparência das nanoemulsões de 7-NI no dia 30 do teste de estabilidade.....	62
Figura 12	Produção de nitrito em cultura de macrófagos J774.....	70

Figura 13	Produção de nitrito por células de músculo liso A7r5.....	71
Figura 14	Avaliação da viabilidade celular.....	72
Figura 15	Imagens representativas da produção de NO em cortes de aorta.....	74
Figura 16	Imagens representativas da produção de NO em cortes de músculo esquelético.....	75
Figura 17	Quantificação da inibição na produção de NO pelo 7-NI e NE 7-NI em cortes de aorta e músculo esquelético.....	76
Figura 18	Efeito do 7-NI e da nanoemulsão de 7-NI na sobrevida de ratos sépticos pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	77
Figura 19	Efeito do 7-NI e da nanoemulsão de 7-NI na sobrevida de camundongos com sepse induzida por pneumonia.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre parâmetros de caracterização das formulações de MCT e rícino brancas.....	53
Tabela 2	Comparação entre parâmetros de caracterização das formulações de MCT e óleo de rícino contendo 7-NI.....	54
Tabela 3	Parâmetros de caracterização das nanoemulsões de 7-NI, avaliados para a escolha da formulação de trabalho.....	55
Tabela 4	Dados da repetibilidade e da precisão intradia e interdias para o 7-NI.....	58
Tabela 5	Valores do ensaio de exatidão para o 7-NI.....	59
Tabela 6	Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do 7-NI.....	59

LISTA DE ABREVIações

7-NI	7-nitroindazol
A/O	Água em óleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APO	Apolipoproteína
BH₄	Tetrahidrobiopterina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D.P.R.	Desvio padrão relativo
E.P.M.	Erro padrão da média
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Mononucleotídeo de flavina
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IFN-γ	Interferon- γ
LD	Limite de detecção
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação
MCT	Triglicerídeo de cadeia média
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Nanoemulsão
NE 7-NI	Nanoemulsão de 7-nitroindazol
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NMDAR	Receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico
NO	Óxido nítrico
NO\cdot	Monóxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS-1	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintase induzida
NOS-3	Óxido nítrico sintase endotelial

O/A	Óleo em água
O₂^{·-}	Ânion superóxido
PDI	Índice de polidispersão
PDZ	Domínio de proteínas PSD95, DlgA e zo-1
PEG	Polietilenoglicol
PIT	Temperatura de inversão de fases
PMCA4b	Bomba de efluxo de cálcio 4b
RyR	Receptor de Rianodina
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. ÓXIDO NÍTRICO E AS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES.....	29
1.2. ÓXIDO NITRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1).....	32
1.3. SEPSE: DEFINIÇÃO E PAPEL DO NO.....	34
1.4. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	36
1.5. NANOEMULSÕES.....	38
1.6. 7-NITROINDAZOL.....	44
PARTE I.....	46
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1. MATERIAIS.....	46
3.2. MÉTODOS.....	46
3.2.1. Preparação das nanoemulsões.....	46
3.2.2. Caracterização físicoquímica das nanoemulsões.....	47
3.2.2.1. Determinação do diâmetro médio da gotícula e distribuição granulométrica.....	47
3.2.2.2. Determinação do potencial zeta.....	48
3.2.3. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de CLAE para determinação do 7-NI.....	48
3.2.3.1. Condições cromatográficas.....	48
3.2.3.2. Validação do método analítico.....	48
3.2.3.2.1. Especificidade.....	49
3.2.3.2.2. Linearidade.....	49
3.2.3.2.3. Limites de detecção e quantificação.....	49
3.2.3.2.4. Precisão.....	49
3.2.3.2.5. Exatidão.....	50
3.2.3.2.6. Robustez.....	50
3.2.3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões.....	50
3.2.4. Estudo de estabilidade.....	51
3.2.5. Análise estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Preparação e caracterização das anoemulsões.....	51
4.2. Validação de metodologia analítica.....	55

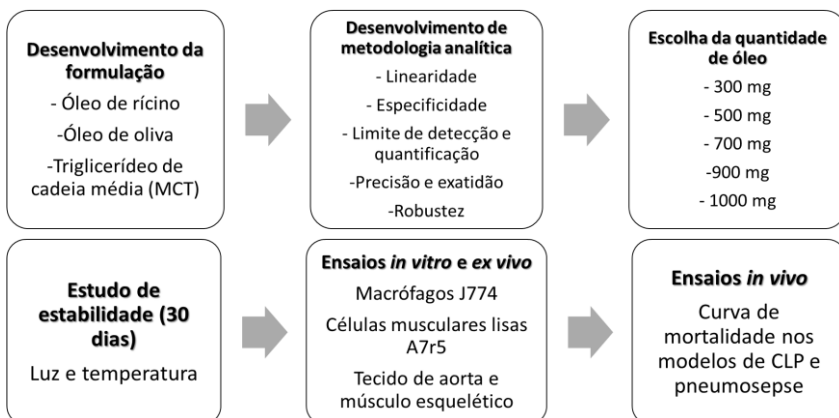
4.2.1. Especificidade.....	55
4.2.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	56
4.2.3. Precisão	58
4.2.4. Exatidão.....	58
4.2.5. Robustez.....	59
4.3. Estudo de estabilidade.....	60
 PARTE II.....	 63
5. OBJETIVO.....	63
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
6.1. MATERIAIS.....	63
6.1.1. Cultura de células.....	63
6.1.2. Animais.....	64
6.2. MÉTODOS.....	65
6.2.1. Avaliação indireta da produção de NO.....	65
6.2.2. Avaliação da viabilidade celular.....	66
6.2.3. Avaliação direta da produção de NO: sonda fluorescente DAF-FM DA.....	67
6.2.4. Indução de sepse por cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e por inoculação de bactéria via pulmonar.....	68
6.2.5. Curvas de sobrevivência.....	69
6.2.6. Análise estatística.....	69
7. RESULTADOS.....	69
7.1. Efeito do 7-NI livre e nanoencapsulado na produção de NO em macrófagos e células musculares lisas.....	69
7.2. Avaliação da viabilidade celular.....	72
7.3. Mensuração da produção de NO por sonda fluorescente em cortes de aorta e músculo esquelético.....	73
7.4. Curvas de sobrevivência.....	77
8. DISCUSSÃO.....	79
9. PERSPECTIVAS.....	86
10. CONCLUSÕES.....	87
11. REFERÊNCIAS.....	88

Consideração inicial

Levando em consideração dados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Duma et al., 2011; Nardi et al., 2014) que mostram a efetividade do inibidor seletivo da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (NOS-1), o 7-nitroindazol, na prevenção do desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória e também na melhora da reatividade vascular presente na fase tardia da sepe, associados a informações da literatura acerca do curto tempo de vida deste composto, o objetivo geral do projeto que norteou esta dissertação foi desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica do tipo nanoemulsão para carreamento do composto 7-nitroindazol, utilizando o processo de emulsificação espontânea.

Os tópicos Objetivos, Materiais e Métodos e Resultados deste trabalho encontram-se divididos em duas partes: na Parte I estão contidos o desenvolvimento e a caracterização físico-química de nanoemulsão contendo 7-nitroindazol e, na Parte II, a etapa de caracterização farmacológica desta nanoemulsão de 7-nitroindazol.

Fluxograma geral do trabalho:



1. INTRODUÇÃO

1.1. ÓXIDO NÍTRICO E AS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES

Na década de 80, Furchgott & Zawadski constataram, em experimento utilizando aortas isoladas de coelho, que o endotélio intacto era fundamental para o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina, evidenciando que este tipo celular produzia um fator lábil responsável pela resposta de relaxamento vascular, o qual chamaram de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Experimentos posteriores demonstraram que este efeito ocorria em diferentes vasos em resposta a diversos agentes vasodilatadores, como a bradicinina, trombina e a substância P. Porém, outros agentes vasodilatadores, como os nitrovasodilatadores orgânicos, causavam relaxamento mesmo na ausência do endotélio. Nos 6 anos seguintes, evidências relacionadas à caracterização do EDRF foram acrescentadas, entre elas o tempo de meia-vida (da ordem de segundos), a inibição de sua ação pelo azul de metileno, a sua menor biodisponibilidade causada pelo ânion superóxido (O_2^-), além da sua capacidade em inibir a agregação plaquetária. No ano de 1986, Ignarro e colaboradores sugeriram que o EDRF poderia ser o óxido nítrico (NO) ou então alguma molécula semelhante a ele, devido ao similar comportamento farmacológico. Então, no ano de 1987, Palmer e colaboradores mostraram que o EDRF e o NO tinham exatamente a mesma ação, tempo de ação e inibição, identificando então o EDRF como sendo o NO (revisto em Moncada et al., 1991).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de estrutura simples, que possui um elétron desemparelhado e é altamente reativo a radicais livres e metais de transição, como por exemplo o ferro do grupo heme (Beckman & Koppenol, 1996). Produzido por muitos tipos celulares, o NO participa de diversos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular (revisto em Stamler, 1993), inibição da agregação plaquetária (Mellion et al., 1989), neurotransmissão (Bredt & Snyder, 1992), nocicepção (Meller & Gebhart, 1993) e da função erétil (Burnett, 1997). Sua produção se dá por enzimas chamadas óxido nítrico sintases

(NOS), que são encontradas em 3 diferentes isoformas. Duas delas são expressas constitutivamente, a óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1 ou nNOS) e a óxido nítrico sintase endotelial (NOS-3 ou eNOS). A terceira isoforma, a óxido nítrico sintase induzida (NOS-2 ou iNOS), tem sua expressão induzida por citocinas, como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), e também por produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) (Kleinert et al., 2004).

As isoformas constitutivas têm sua atividade dependente da presença dos cofatores (NADPH, FAD, FMN e BH_4) e também de cálcio, necessitam da ligação cálcio-calmodulina à enzima para facilitar a atividade catalítica. A produção de NO pelas isoformas constitutivas ocorre em concentrações nanomolares (Mattila & Thomas, 2014).

A NOS-3 encontra-se expressa em muitos tecidos, como endotélio, hipocampo, pulmão, cardiomiócitos, fígado e plaquetas (Randriamboavonjy & Flemin, 2005; Förstermann & Sessa, 2012). O NO provindo desta isoforma participa de processos de vasodilatação, proliferação de células musculares lisas, permeabilidade endotelial, agregação e adesão plaquetárias. Sua atividade é regulada por fatores como a tensão de cisalhamento de fluidos, hipóxia, fosforilação e localização celular. Pode ser encontrada no citosol, complexo de Golgi, no contato entre as células, mas é nas cavéolas da membrana plasmática que parece ter a maior importância na produção do NO (Shaul, 2002; Govers & Oess, 2004).

Assim como as NOS constitutivas, a NOS-2 tem sua atividade dependente da presença dos cofatores, porém, devido à alta afinidade pelo domínio de ligação da calmodulina, esta isoforma pode funcionar mesmo em ausência de cálcio. Foi primeiramente identificada em macrófagos, mas hoje já se sabe que sua expressão pode ser induzida virtualmente em todos os tipos celulares, pela ação de citocinas, como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1β e também por produtos bacterianos, como lipopolissacarídeo (LPS). Produz NO de maneira constante e em concentrações micromolar, com finalidade fisiológica de eliminar microrganismos e células tumorais (Förstermann & Sessa, 2012; Govers & Oess, 2004).

As NOS precisam estar na forma de homodímeros para serem ativas cataliticamente. No seu estado funcional, há transferência de elétrons do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH), através das flavinas (FAD e FMN) do grupo carboxi terminal do domínio redutase, para o heme contido na região amino terminal do domínio oxidase, onde ocorre a ligação do oxigênio molecular, do cofator (6R-)5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH₄) e do substrato L-arginina. Os elétrons previamente transferidos para o grupo heme, são utilizados para reduzir o oxigênio e oxidar a L-arginina, formando então, os produtos L-citrulina e NO (Figura 1) (Förstermann & Sessa, 2012).

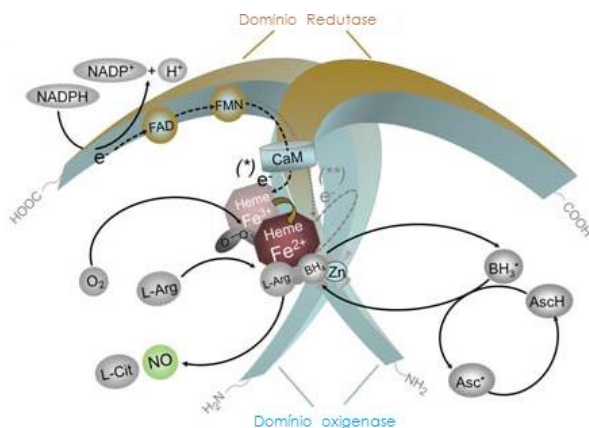


Figura 1. Estrutura das NOS e mecanismo de formação do NO. A enzima torna-se ativa cataliticamente quando na forma de homodímero. A ligação da calmodulina (CaM) facilita a migração de elétrons (e⁻) do NADPH, através das flavinas (FAD e FMN), até o grupo heme. Na região do heme se ligam também os substratos L-arginina (L-Arg) e O₂, além do cofator (6R-) 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH₄), permitindo a formação de NO e L-citrulina (L-Cit). Adaptada de Förstermann & Sessa, 2012.

Após sintetizado, o NO pode atuar em diversos alvos. Reage com outros radicais, como o monóxido de nitrogênio (NO[•]) e o ânion superóxido (O₂⁻), podendo levar à formação de produtos ainda mais reativos. Também pode interagir

diretamente com proteínas, causando a nitrosilação de grupamentos tióis de resíduos livres de cisteína e nitração de fenóis de resíduos de tirosina, podendo prolongar seu tempo de meia vida. Por exemplo, a nitrosilação da albumina sérica, com a formação de S-nitrosoalbumina permite a formação de um “reservatório” de NO (Stamler et al., 2004). Como segundo mensageiro, o NO age ativando a guanilato ciclase solúvel através de sua interação com o grupo heme, o que gera mudança conformacional da enzima, havendo exposição do sítio catalítico do GTP e magnésio, permitindo a formação do GMP cíclico (GMPc). O GMPc formado pode agir sobre a fosfodiesterase (PDE), sobre canais iônicos e sobre a proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Em células musculares lisas, a PKG age sobre canais iônicos e fosforila resíduos de serina e treonina de enzimas, como a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK), a qual promove a fosforilação da miosina, impedindo sua interação com a actina, com consequente relaxamento muscular (Denninger & Marletta, 1999). Entretanto, o NO não participa apenas de processos homeostáticos. A desregulação da produção de NO está envolvida em numerosos processos patológicos, como em doenças neurodegenerativas (Guix et al., 2005), câncer (Wink et al., 1998), hipertensão, diabetes (Naseem, 2005) e sepse (Titheradge, 1999).

1.2. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1)

A NOS-1 foi primeiramente isolada em cerebelo porcino (Mayer et al, 1990) e hoje se sabe que é a principal fonte de NO em células do SNC, inclusive neurônios, encontrando-se amplamente distribuída pelo sistema nervoso central e periférico (Gotti et al., 2005). É também expressa nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso, além de células da mácula densa e ilhotas pancreáticas (Förstermann & Sessa, 2012). Possui peso molecular da ordem de 161 kD, com cerca de 1.434 resíduos de aminoácidos e, assim como as demais NO sintases, apresenta atividade catalítica quando dimerizada. Tem sua atividade regulada por mecanismos que envolvem fosforilação e interação com outras proteínas através do domínio PDZ (ver adiante) (Zhou & Zhu, 2009).

A NOS-1 pode ser encontrada no citoplasma ou ancorada à membrana plasmática. Sua ligação à membrana ocorre através da interação com outras proteínas, através de uma sequência de aproximadamente 90 aminoácidos contidos no domínio N-terminal, chamada de domínio PDZ, presente unicamente nesta isoforma. Sua localização nos sítios sinápticos é proporcionada por sua interação com o domínio PDZ de proteínas como a PSD-93 e PSD-95 (proteínas de densidade pós-sinápticas com 93 e 95 kD, respectivamente), sendo que a última se liga também com o receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), possibilitando a interação deste receptor com a NOS-1. Da mesma forma, o domínio PDZ da NOS-1 interage com a proteína adaptadora solúvel CAPON, o que parece ser um mecanismo de regulação da localização da NOS-1, visto que a CAPON compete com as PSD na ligação ao domínio PDZ da enzima (Figura 2A) (Riefler & Firestein, 2001). No músculo esquelético, a NOS-1 associa-se à membrana plasmática pela ligação ao domínio PDZ contido na proteína α 1-sintrofina que faz a interação entre a enzima e o complexo distrofina-distroglicana no sarcolema (Figura 2B) (Brenman et al, 1995). Também já é descrita a interação com o domínio PDZ da bomba de efluxo de cálcio (PMCA4b) na cavéola de diferentes tipos celulares, e sabe-se que há ligação com o retículo sarcoplasmático de cardiomiócitos, provavelmente envolvendo a interação com receptores de rianodina (RyR) (Figura 2C) (Barouch et al., 2002).

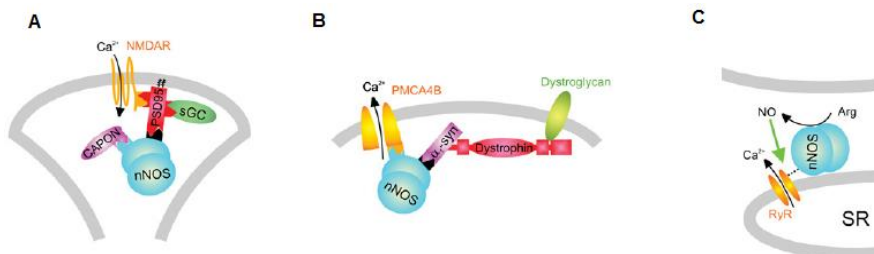


Figura 2. Localização da NOS-1 em diferentes tipos celulares. Nas sinapses (A), no músculo esquelético (B) e cardiomiócitos (C). Modificada de Oess et al., 2006.

Tendo em vista sua localização, o NO proveniente da isoforma neuronal está envolvido em importantes processos fisiológicos. No SNC tem papel na plasticidade sináptica e neurotransmissão, no músculo esquelético atua na dilatação de vasos sanguíneos, permitindo o aumento da irrigação muscular para contração adequada, no retículo sarcoplasmático cardíaco participa da regulação autócrina da contratilidade cardíaca, entre outras (Govers & Oess, 2004). Por outro lado, o desbalanço na produção do NO pela NOS-1 é relatado como contribuinte em processos patológicos como isquemia (Eliasson et al., 1999), doença de Parkinson (Gatto et al., 2000), insuficiência cardíaca congestiva (Damy et al., 2004) e sepse (Gocan et al., 2000; Nardi et al., 2014).

1.3. SEPSE: DEFINIÇÃO E PAPEL DO NO

A sepse tem desafiado médicos e cientistas devido à dificuldade tanto de diagnóstico quanto no tratamento desta condição, que é a maior causa de mortes em pacientes hospitalizados. Os dados epidemiológicos disponíveis apontam a ocorrência da enfermidade em 2% de todas as hospitalizações, aumentando para 6-30% em pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) de países desenvolvidos (Martin, 2012). Nos Estados Unidos, por exemplo, são 750.000 casos, com mais de 100.000 mortes ao ano (Angus et al., 2001). No Brasil, em estudo coorte desenvolvido por Silva e colaboradores (2004), a taxa de mortalidade de pacientes com sepse nas UTIs foi de 34,7%, podendo atingir 52,2% com a evolução da doença.

Trata-se de uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) secundária a uma infecção, causada na maior parte dos casos por bactérias (gram negativas > gram positivas), mas também podendo ser proveniente de fungos, vírus ou parasitas (Titheradge, 1999). O prognóstico desfavorável leva ao desenvolvimento da sepse grave, com o surgimento do quadro de hipotensão e hipoperfusão tecidual, podendo culminar no choque séptico, o estágio mais grave da doença e com maior índice de mortalidade, no qual os pacientes apresentam hipotensão refratária à reposição volêmica e à administração de

vasoconstritores, além de disfunção de múltiplos órgãos (Rangel-Frausto et al, 1995).

Muitos trabalhos evidenciam o envolvimento do NO no desenvolvimento da sepse. É sabido que há aumento dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (produtos do metabolismo do NO) em pacientes sépticos e em choque séptico (Evans et al., 1993). Se por um lado o aumento de NO é benéfico por sua ação microbicida, fazendo parte da resposta imune adaptativa, atuando, assim, como mecanismo de defesa do hospedeiro (Nathan & Hibbs Jr, 1991) por outro, sua produção exacerbada está envolvida na hipotensão e hiporresponsividade à vasoconstritores. Hollenberg e colaboradores (2000) mostraram que o NO proveniente da NOS-2 no choque séptico piora a resposta microvascular à vasoconstritores e aumento da mortalidade, pois animais *knockout* para esta isoforma mostram melhora em ambos os parâmetros.

Já está descrito na literatura que há um *cross-talk* entre as isoformas constitutivas da NOS com a NOS induzida (Persichini et al., 2006), ou seja, o aumento da produção de NO pela NOS-1 e NOS-3 (Connelly et al., 2005; Vo et al., 2005), pela ativação do NF- κ B, induz a expressão da NOS-2, estando as NOS constitutivas também estreitamente envolvidas na sepse.

O NO proveniente da NOS-1 atua como sinal de disparo no desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica, visto que o pré-tratamento com inibidor da NOS-1, o 7-nitroindazol (ver acima), previne a mortalidade de ratos sépticos, enquanto que o tratamento após indução da sepse não altera o curso da inflamação (Duma et al., 2011). Também, a rápida produção do NO pela isoforma neuronal, com consequente indução do NF- κ B, leva à expressão da NOS-2 em células musculares lisas estimuladas com LPS/IFN, sugerindo que a NOS-1 esteja envolvida na disfunção vascular da sepse (Scheschowitsch et al., 2015). Também já se sabe que o NO aumentado em tempos tardios da sepse (24 após sua indução pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco em ratos) é proveniente do aumento da expressão da NOS-1 em vasos. Mais ainda, sua associação física com a guanilato ciclase solúvel (GCs), tem impacto direto no prejuízo da vasodilatação em microvasos da musculatura

esquelética e na progressiva hipotensão e hiporreatividade à vasoconstritores (Gocan et al., 2000; Nardi et al, 2014).

1.4. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Nanotecnologia é uma área da ciência e tecnologia que implica na síntese, caracterização e utilização de materiais e dispositivos de escala nanométrica (um bilionésimo de um metro) (Sahoo et al., 2007; Figura 3). O termo nanotecnologia é derivado da palavra grega “nano”, que significa anão. Foi utilizado pela primeira vez em 1959, pelo físico americano Richard Feynman, que explorou a possibilidade de manipular materiais em escala de átomos e moléculas (Sahoo & Labhasetwar, 2003).

Os primeiros impulsos para o uso da nanotecnologia aconteceram nos anos 70, pela indústria eletrônica, com o intuito de desenvolver dispositivos menores, mais rápidos e complexos (Sahoo & Labhasetwar, 2003). Atualmente, a nanotecnologia é um campo multidisciplinar que permite a criação de dispositivos e produtos em áreas como tecnologia da informação, ciências ambientais, engenharia de materiais e na área biomédica (Doll et al., 2012).

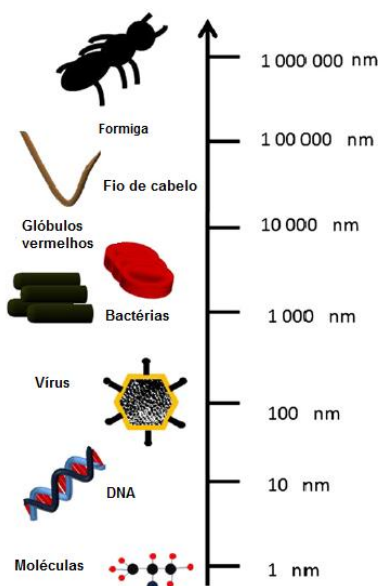


Figura 3. Escala de tamanhos. Variação de escala de 1 milímetro (1.000.000 nm) a 1 nanômetro exemplificada. Adaptado de Boisseau & Loubaton, 2011.

A nanomedicina faz uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de novos dispositivos e materiais com a finalidade de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, como estratégia de liberação de fármacos e na terapia gênica, no diagnóstico *in vitro*, em técnicas de imagem, na produção de biomateriais e na engenharia de tecidos (Dattta & Jaitawat, 2005; Shi et al., 2010).

Os sistemas de carreamento de fármacos têm como objetivo melhorar o efeito terapêutico e minimizar a toxicidade. Para moléculas que apresentam potencial terapêutico, mas possuem baixa solubilidade em água, toxicidade ou curto tempo de meia vida plasmático, o desenvolvimento de formulações em escala nanométrica proporciona melhoria nas propriedades farmacológicas (Sahoo & Labhasetwar, 2003; Koo et al., 2005; Shi et al., 2010).

Os lipossomas foram os primeiros carreadores de fármacos e proteínas descritos, utilizados a partir da década de 1960 (Koo et

al., 2005). Desde então, a nanotecnologia tem progredido no desenvolvimento de novos sistemas e métodos de produção (Figura 4), possibilitando estratégias como a vetorização passiva ou ativa (com a adição de anticorpos ou ligantes não imunogênicos à formulação) de fármacos para sítios específicos (como células cancerígenas, SNC) ou, mais recentemente, a possibilidade de diagnóstico e tratamento em um mesmo sistema nanométrico, os chamados teranósticos, os quais unem agentes de carregamento e de imagem. Atualmente, diversos produtos com base nanotecnológica encontram-se disponíveis no mercado farmacêutico, de maneira evidente aqueles que usam a tecnologia dos nanocristais, as micro e nanoemulsões e os lipossomas (Sahoo et al., 2007; Shi et al., 2010; Lammers et al., 2011).

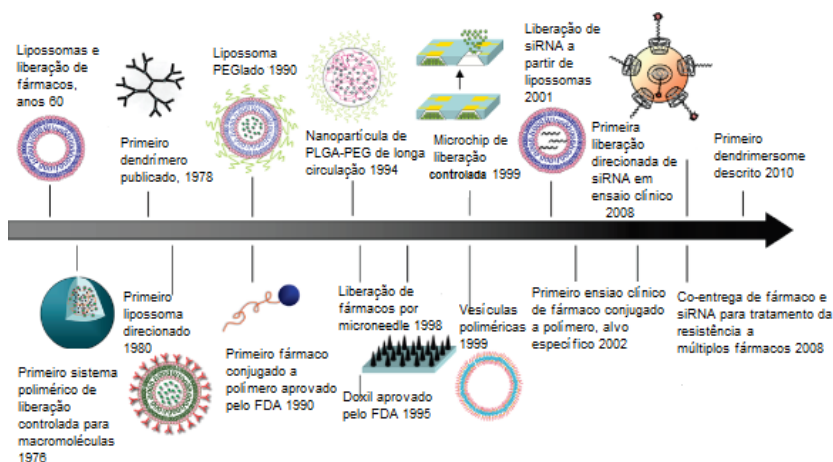


Figura 4. Linha do tempo da aplicação da nanotecnologia na liberação de fármacos. Adaptado e modificado de Shi et al., 2010.

1.5. NANOEMULSÕES

Dispersões coloidais têm ganhado atenção por parte das indústrias farmacêutica e de alimentos como sistemas de proteção e liberação de fármacos, nutraceuticos, vitaminas, entre

outros (McClements, 2012). Dentre estas, as emulsões são sistemas coloidais compostos de duas fases líquidas imiscíveis, nos quais uma fase encontra-se dispersa (interna) em outra contínua (externa). A fase contínua pode ser aquosa, caracterizando uma emulsão óleo em água (O/A) ou oleosa, definida como emulsão água em óleo (A/O). São sistemas cineticamente, mas não termodinamicamente estáveis devido à alta tensão interfacial entre as duas partes (Santana-Solano, 2012).

Nanoemulsões apresentam tamanho de gota entre 50 a 1000 nm, sendo mais aceito pela literatura o uso de sistemas de até 500 nm de diâmetro (Almeida et al., 2008; Lovelyn & Attama, 2011). O uso destes sistemas possibilita algumas vantagens em relação às emulsões macrométricas. Devido ao reduzido tamanho de gotícula, há diminuição do movimento browniano e da ação da gravidade, diminuindo a tendência à agregação das gotas ou separação gravitacional das fases. As nanoemulsões permitem a encapsulação de substâncias pouco solúveis em água e a elevada área de superfície decorrente do tamanho reduzido das gotas promove melhorias na absorção e biodisponibilidade oral de fármacos. Além disso, estes sistemas são melhor tolerados pelo organismo, uma vez que: i) se assemelham aos quilomicrons endógenos; ii) proporcionam menor irritabilidade, quando administradas por via endovenosa; iii) no uso cutâneo, propiciam deposição uniforme na pele e iv) devido a possibilitar o efeito de permeabilidade e retenção (EPR) mostram-se ferramenta interessante no tratamento do câncer (Bouchemal et al., 2004; Prakash & Thiagarajan, 2011; Ganta et al., 2014; Jaiswal et al., 2015).

A formação de nanoemulsões depende de, no mínimo, três constituintes: água, óleo e um agente estabilizante da interface. A escolha da fase oleosa se dá pela solubilidade apresentada pelo fármaco a ser encapsulado, sendo o estudo de solubilidade do fármaco ao óleo, a primeira etapa testada no desenvolvimento da formulação. Triglicerídeos, como os triglicerídeos de cadeia média (MCT), óleos vegetais, como óleo de oliva, de soja, de algodão ou de rícino, além de óleos minerais podem ser usados para compor a fase oleosa. Os agentes estabilizantes, chamados emulsificantes, reduzem a tensão interfacial das gotículas,

proporcionando estabilidade ao sistema e exemplos incluem emulsificantes de fase orgânica, como as lecitinas, provenientes do ovo e da soja e os surfactantes de fase aquosa, como os ésteres do sorbitano etoxilados (ex. Tween 80) e do polietilenoglicol (ex. Solutol HS15). Em nanoemulsões destinadas ao uso parenteral e ocular, além de surfactantes, também são adicionados na fase aquosa, agentes de manutenção da osmolaridade (Bruxel et al, 2012). Mais comumente utilizadas são as nanoemulsões O/A (Figura 5), nas quais a fase orgânica é responsável por carrear compostos ativos lipofílicos. Já nas nanoemulsões A/O, a fase aquosa permite transportar minerais, conservantes, vitaminas, açúcares e proteínas (Odriozola-Serrano et al., 2014).

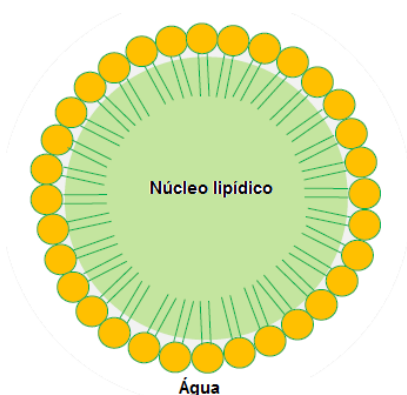


Figura 5. Representação da estrutura da gota de uma nanoemulsão óleo/água. Adaptado de Ganta et al, 2014.

Várias técnicas de produção de nanoemulsões são descritas na literatura, e encontram-se divididas em métodos de alta e baixa energia. Os métodos de alta energia necessitam de equipamentos específicos que fornecem elevada energia mecânica, os quais permitem a quebra da emulsão macrométrica primeiramente formada, em gotículas de escala nanométrica, seguida da adsorção do surfactante. Para isso, faz-se uso de homogeneizadores à alta pressão, microfluidizadores ou do ultrassom que, através de forças de cisalhamento, impacto e

cavitação, possibilitam a formação de emulsões em escala nanométrica (Almeida et al., 2008; Anton et al., 2008).

Por outro lado, os métodos de emulsificação de baixa energia são capazes de formar espontaneamente gotas de reduzido tamanho através do controle das condições de preparo, em decorrência das propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e de outros excipientes utilizados na formulação. Entre eles, o método de inversão das fases emprega tensoativos sensíveis à temperatura, como os polietoxilados, que exibem diferentes solubilidades em função da mesma. Em temperaturas acima da temperatura de inversão de fases (PIT, do inglês *phase inversion temperature*) ocorre a desidratação das cadeias de polioxietileno, tornando-os lipofílicos e permitindo a formação de emulsões A/O; em temperatura ambiente são hidrofílicos, levando a formação de emulsões O/A. O simples emprego da temperatura permite converter fases microemulsionadas em emulsões nanométricas, sem o emprego de forças que produzam o cisalhamento (Shinoda & Saito, 1969; Anton et al., 2008).

Na emulsificação espontânea, as nanoemulsões são formadas pela adição de uma solução de um solvente orgânico miscível na água contendo o componente ativo, o óleo e um surfactante lipofílico, em fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa leva a uma turbulência interfacial, o chamado efeito Marangoni, propiciado a formação de gotas de tamanho reduzido. As nanoemulsões são então submetidas à evaporação em pressão reduzida, para a completa remoção do solvente orgânico. Tal método, descrito por Bouchemal e colaboradores (2004), possui como vantagens a facilidade de execução, exigindo poucas etapas e equipamentos de baixo custo, não necessita a variação de temperatura e leva à formação de nanoemulsões de tamanho reduzido (Almeida et al., 2008).

Após produzidas, as nanoemulsões são submetidas a testes que têm como objetivo a caracterização físico-química das mesmas. O tamanho, índice de polidispersão (PDI, do inglês *polydispersity index*) e potencial zeta das gotículas são parâmetros fundamentais na caracterização e avaliação da qualidade das formulações. Os primeiros podem ser mensurados

a partir do espalhamento de luz dinâmico. Esta técnica é baseada no movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão, que faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise das flutuações da intensidade de espalhamento resultante das diferentes velocidades do movimento browniano é empregada para determinação do tamanho de partícula, usando a relação de Stokes-Einstein. O índice de polidispersão reflete a distribuição de tamanhos de partícula de uma dispersão coloidal; quanto menor este índice, mais monodisperso é o sistema em questão. Técnicas de microscopia também são utilizadas para a caracterização das formulações. As microscopias eletrônicas de varredura e transmissão possibilitam a obtenção de características da superfície, tamanho e forma das partículas (Cho et al., 2013; Lopez-Serrano et al., 2014). O potencial zeta é uma propriedade física exibida por partículas em suspensão, como o resultado das cargas presentes, levando em conta suas forças de atração e repulsão. A magnitude do potencial zeta dará indicações da estabilidade do sistema (Greenwood, 2003) e das possíveis interações do mesmo com os componentes biológicos. O potencial zeta reflete a composição da interface do sistema, em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou à presença de moléculas com carga, localizadas na interface. Além disso, é importante para a avaliação da estabilidade físico-química das emulsões. Partículas com potencial zeta maior que ± 30 mV são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática e a diminuição desse potencial facilita a agregação das partículas, por diminuir a repulsão eletrostática. A anemometria laser-doppler é uma técnica bastante utilizada para a determinação da carga de superfície e leva em consideração a mobilidade eletroforética do sistema (Muller & Heinemann, 1992; Marcato, 2009).

O teor de fármaco contido no sistema e a eficiência com a qual o fármaco é encapsulado nas gotículas são outras propriedades avaliadas na caracterização das nanoemulsões, geralmente utilizando métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou espectrofotometria UV-VIS. Outros ensaios importantes para a avaliação da qualidade de tais sistemas

incluem a avaliação dos perfis de liberação *in vitro* e de estabilidade (Jaiswal et al., 2015).

A melhora de parâmetros farmacocinéticos e de atividade de fármacos através de sistemas nanoemulsionados é reportada na literatura, com uso pelas mais diversas vias de administração (Chime, 2014; Bangia & Om, 2015). Em revisão sobre as propriedades farmacocinéticas das nanoemulsões, Lu e colaboradores (2012) citam exemplos de melhora na biodisponibilidade de fármacos, quando inseridos nestes sistemas. Como exemplo, a ezetimiba, utilizado para o tratamento de dislipidemias e que apresenta uma alta lipofilicidade e baixa solubilidade em meios biológicos, teve sua biodisponibilidade aumentada em 4,77 vezes, quando administrada por via oral na forma de nanoemulsão, em comparação ao comprimido convencional, em ratos (Bali et al., 2010). Shafiq e colaboradores (2007) mostraram um aumento de 2,94 vezes na biodisponibilidade do ramipril, um fármaco anti-hipertensivo, em ratos Wistar, quando este fármaco foi administrado por via oral na forma de nanoemulsão e comparado com a administração da cápsula convencional. A dexametasona, um anti-inflamatório esteroide e que possui seu uso limitado por apresentar diversos efeitos adversos, quando inserida em nanoemulsões (Limethason®) para administração endovenosa, apresentou diminuição na toxicidade e alteração do perfil de biodistribuição, distribuindo-se majoritariamente nos tecidos inflamados (Chime, 2014).

A metabolização de emulsões lipídicas pode acontecer de maneira similar à dos quilomicrons ou através das células do sistema fagocítico. Os quilomicrons, produzidos pelos enterócitos do intestino delgado, possuem apolipoproteínas A-I, A-IV e B-48. Quando deixam a circulação linfática, alcançando a corrente sanguínea, adquirem as apolipoproteínas APO-C-II e APO-E provenientes das lipoproteínas de alta densidade (HDL), e liberam a APO-A-IV. Nos capilares de tecido adiposo e muscular, a lipoproteína lipase (LPL) de células endoteliais hidrolisa os quilomicrons em ácidos graxos. Quilomicrons remanescentes são metabolizados pelo fígado. As nanoemulsões, por sua vez, não possuem apolipoproteínas em sua estrutura, porém, quando na circulação sanguínea, podem adquiri-las das HDLs, sendo então

metabolizadas da mesma forma que os quilomicrons. Seu metabolismo vai depender do tipo de emulsificante, presença de colesterol e comprimento da cadeia do triglicerídeo. Caso as gotículas sejam consideradas corpos estranhos pelo organismo, serão capturadas pelo sistema fagocítico, as células de Kupffer do fígado ou macrófagos do baço, por endocitose, transferindo-as para o lisossoma, onde sofrem degradação enzimática. A remoção de sistemas emulsionados da circulação é facilitado pela adsorção de opsoninas em sua superfície, as quais interagem com receptores em macrófagos e monócitos, favorecendo a endocitose (Rossi e Leroux, 2007).

1.6. 7-NITROINDAZOL

O 7-Nitroindazol (7-NI), é uma pequena molécula heterocíclica que contém um anel indazol e um grupamento nitro na posição 7 (Figura 6). Age como inibidor seletivo *in vivo* sobre óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) (Babbedge et al., 1993).

A restrição da disponibilidade de NO pode se dar de diversas maneiras, pela diminuição da oferta ou inibição da captação da L-arginina, pela redução da biodisponibilidade do NO já formado (pela ação de *scavengers*), pela inibição da atividade da NOS de maneira direta, pela menor disponibilidade de cofatores, ou ainda, pela inibição de sítios de ligação de cofatores (Moore & Handy, 1997). O composto 7-nitroindazol (7-NI) atua de maneira seletiva sobre a NOS-1 *in vivo*, através da ligação reversível ao grupo heme desta enzima, impedindo a ligação do cofator BH4 (Bush & Pollack, 2000) e competindo com a L-arginina (Klatt et al., 1994).

Quando comparado aos outros indazóis, o 7-NI mostrou maior potência na inibição da NOS, quando testados sobre a NOS-1 bovina purificada (Wolf & Gribin, 1994). O composto possui características lipofílicas e sua seletividade para a NOS-1 é demonstrada pela sua ineficácia em alterar o relaxamento dependente de endotélio em vasos sanguíneos isolados e em alterar a pressão arterial de ratos anestesiados, evento dependente da NOS-3 (Babbedge et al., 1993; Moore, 1993). Também, Nardi e colaboradores (2014) mostraram que o 7-NI não altera a pressão arterial média de animais sépticos, os quais

apresentam uma hipotensão severa, o que corrobora com a ação seletiva *in vivo* para a isoforma neuronal.

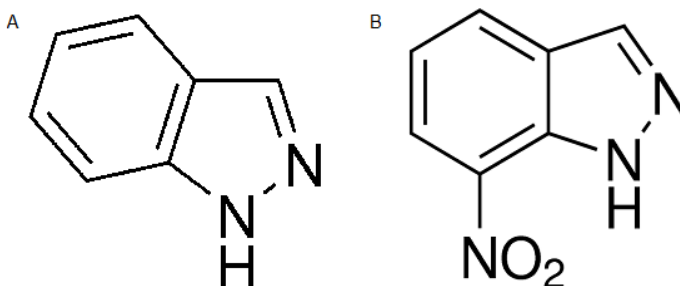


Figura 6. A) Estrutura molecular do grupamento indazol. B) Estrutura do 7-nitroindazol.

Um estudo desenvolvido por Bush e Pollack (2000) esclareceu aspectos referentes da farmacocinética do 7-NI. Neste estudo foi mostrado que este composto, quando administrado pela via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg em ratos, apresentou uma área sobre a curva plasmática cerca de 30 vezes maior que aquela obtida após a administração de uma dose de 10 mg/kg, mostrando um perfil dose-dependente. Entretanto, o tempo de meia vida deste composto mostrou ser 3 vezes maior na maior dose, sendo de aproximadamente 87 minutos. Assim, o tempo de meia vida deste composto pode ser considerado baixo, mesmo após a administração de uma dose alta, não ultrapassando duas horas.

Quando testado com o intuito de melhorar a resposta aos vasoconstritores na fase tardia da sepse (resposta dependente da ação da NOS-1) mostrou-se eficaz, porém sua ação foi efêmera, devido ao curto tempo de meia-vida, cerca de 30 minutos na dose de 10 mg/kg (Nardi et al., 2014).

Assim, a encapsulação do 7-NI em nanoemulsões pode trazer vantagens na farmacocinética do composto, com aumento da biodisponibilidade e tempo de meia vida plasmático possibilitando, em consequência, melhor ação inibitória sobre a NOS-1.

PARTE I

2. OBJETIVOS

- Preparar e caracterizar as nanoemulsões lipídicas contendo 7-NI quanto ao tamanho, potencial zeta, teor, recuperação, eficiência de encapsulação;
- Desenvolver e validar um método analítico de CLAE para quantificação do 7-NI nas nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões contendo 7-NI frente ao armazenamento: fotoestabilidade e temperatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Triglicerídeo de cadeia média (TCM, Ritamollient CCT) foi adquirido de Braskem (Brasil). Óleo de rícino, de soja e de oliva, o polissorbato 80 (Tween 80), e o 7-nitroindazol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Lecitina de soja hidrogenada (100% fosfatidilcolina, Lipoid S100) foi adquirida da Lipoid GmbH (Alemanha) e o glicerol da Neon (Brasil). Etanol grau analítico e acetonitrila grau CLAE foram obtidos da Vetec (Brasil) e Tedia (EUA), respectivamente. Água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA) e tampão acetato de amônia da Synth (Brasil).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação das nanoemulsões

O preparo das nanoemulsões O/A se baseou no método de emulsificação espontânea, descrito por Bouchemal e colaboradores (2004). Uma fase orgânica contendo o óleo, a lecitina de soja (7 mg) (Lipoid S100) e o 7-NI (10 mg) em 20 mL de etanol foi vertida em 60 mL uma solução aquosa contendo glicerol (concentração final 2,25%) e polissorbato 80

(concentração final de 0,2%). A nanoemulsão é formada instantaneamente após difusão do solvente orgânico na fase aquosa, e mantida sob agitação magnética por 5 minutos, para fornecer equilíbrio ao sistema. O solvente orgânico foi, então, removido da formulação em sua totalidade por meio de evaporação em evaporador rotatório R-114 (Fisatom, Brasil), e as dispersões coloidais foram concentradas até o volume final de 20 mL. Após 1 hora da evaporação do solvente, as nanoemulsões foram filtradas através de papel filtro quantitativo de 8 μm (Millipore, EUA) e acondicionadas para posterior caracterização. Formulações de nanoemulsões brancas (sem 7-NI) dos óleos de rícino, oliva e triglicerídeos de cadeia média foram testados em diferentes quantidades (200 a 500 mg). Formulações dos óleos de rícino e MCT contendo 7-NI foram testadas em diferentes concentrações (200 a 500 mg). Formulações do óleo selecionado para o desenvolvimento do trabalho (óleo de rícino) foram testadas nas concentrações de 200 a 1000 mg. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

3.2.2. Caracterização físicoquímica das nanoemulsões

3.2.2.1. Determinação do diâmetro médio da gotícula e distribuição granulométrica

A determinação do diâmetro de gotícula e do índice de polidispersão foi feita em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição apropriada das amostras em água ultrapura. Cada análise de tamanho teve duração de 120 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173°.

3.2.2.2. Determinação do potencial zeta

O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado por anemometria laser-Doppler em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Cinquenta microlitros das amostras foram diluídas em 15 mL de água ultrapura e acondicionadas em cubeta específica, onde o potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética obtidos, usando a equação de Smoluchowski.

3.2.3. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de CLAE para determinação do 7-NI

3.2.3.1. Condições cromatográficas

A quantificação do 7-NI foi feita em cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD e detector UV-VIS modelo SDP-10AVP (Kyoto, Japão) em comprimento de onda de 360 nm. Utilizou-se coluna de fase reversa Luna C18 5 μ m (150 x 4,60 mm – Phenomenex, USA) mantida a 25 °C e contendo uma pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm – Phenomenex, USA). O sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 1 mL/min a 25°C, com fase móvel de tampão acetato de amônia (25 mM, pH ajustado com NaOH 0,1M para 8,0) e acetonitrila (50:50 v/v), filtrados em membrana 0,45 μ m de acetato de celulose e poliamida, respectivamente (Millipore, USA). A detecção foi realizada no UV no comprimento de onda de 360 nm.

3.2.3.2. Validação do método analítico

O método cromatografia líquida descrito acima foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão (BRASIL, 2003). A concentração da solução de trabalho foi de 15 μ g/mL foi preparada a partir de solução estoque de 7-NI na concentração de 500 μ g/mL em etanol. Soluções padrões foram preparadas no dia da análise.

3.2.3.2.1. Especificidade

Para avaliar possíveis interferências dos excipientes da formulação na quantificação do 7-NI, soluções dos excipientes glicerol, Tween 80, óleo de rícino e lecitina na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila foram analisados por CLAE, nas condições descritas acima.

3.2.3.2.2. Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, em seis concentrações na faixa de 1,0 a 25,0 µg/mL de 7-NI. A partir dos resultados, gráficos de área do pico *versus* concentração de 7-NI foram construídos, e o coeficiente de correlação e a equação da reta foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados, usando o Software Prism® (Graphpad software, EUA). Antes do início das análises, a coluna foi equilibrada com pelo menos 20 minutos de fluxo de fase móvel pelo sistema.

3.2.3.2.3. Limites de detecção e quantificação

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) do método foram calculados usando as seguintes equações:

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \quad LD = \frac{3\sigma}{s}$$

Em que, σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, obtido a partir de três curvas de calibração, e s é a inclinação da curva de calibração (ICH, 2005).

3.2.3.2.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária de amostras contendo 15 µg/mL de 7-NI. A repetibilidade foi examinada após seis análises de cada amostra, no mesmo dia e sob as mesmas condições. A precisão intermediária foi avaliada após análise das amostras em

triplicata em três dias diferentes. O método é considerado preciso quando os valores de desvio padrão relativo (D.P.R) forem menores que 5% (BRASIL, 2003).

3.2.3.2.5. Exatidão

A exatidão foi definida pela recuperação de quantidades conhecidas da substância padrão adicionada à NE 7-NI contendo 7,5 µg/mL de 7-NI. Os níveis de 7-NI adicionados foram 4,5; 7,5 e 10,5 µg/mL correspondendo a 80%, 100% e 120% da concentração escolhida, respectivamente. Cada uma das soluções foi preparada em triplicata e injetada três vezes. A exatidão foi calculada como sendo a percentagem de fármaco recuperado em cada amostra. O método é considerado exato quando valores de recuperação entre 90 e 110% são obtidos.

3.2.3.2.6. Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por meio da análise do teor de composto após variação das seguintes condições cromatográficas: fluxo (0,9 e 1,1 mL/min), pH da fase móvel (pH 7,9 e 8,1), composição da fase móvel (48:52 e 52:48 – acetonitrila: tampão) e comprimento de onda (348 e 352 nm).

3.2.3.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões

O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi determinado por CLAE nas condições acima descritas. Setecentos e cinquenta µL das amostras foram diluídos em 25 mL da fase móvel. As amostras diluídas foram, então, filtradas em membrana de nylon (0,45 µm) e analisadas em CLAE. A análise das amostras foi feita em triplicata e as áreas médias dos picos referentes ao 7-NI foram comparadas à área da solução padrão de concentração conhecida (15 µg/mL) analisada nas mesmas condições. O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi expresso como mg/mL.

Para a avaliação da eficiência de encapsulação, as nanoemulsões foram submetidas à ultrafiltração/centrifugação, usando unidades Microcon® com membrana Ultracel YM-100

(100.000 NMWL, Millipore, EUA). Volumes de 500 μ L de cada uma das formulações foram adicionados nas unidades de filtração e centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. O filtrado foi analisado por CLAE, nas condições previamente descritas. A eficiência de encapsulação (%) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de fármaco e a sua concentração no sobrenadante.

3.2.4. Estudo de estabilidade

A estabilidade do 7-NI na forma de nanoemulsão foi avaliada após o armazenamento das amostras em três diferentes condições: após exposição ao UV (254 nm, SANKYO DENKI), na ausência de luz à temperatura ambiente (25°C) e em geladeira a 4°C. O teor de 7-NI das formulações foi avaliado por CLAE nos dias 0, 5, 10, 15 e 30, conforme metodologia descrita acima. Também foi avaliado o tamanho de gota e potencial zeta.

3.2.5. Análise Estatística

Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M, à exceção dos resultados expressos em porcentagem, nestes os valores encontram-se como a média \pm D.P.R. O desvio padrão relativo (D.P.R) representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média. Todas as avaliações foram feitas em triplicata. A análise do resultado referente à cinética de degradação das nanoemulsões de 7-NI foi feita por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Preparação e caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea (Bouchemal et al., 2004). Inicialmente a concentração de 7-NI testada nas formulações foi de 1 mg/mL, porém, quando o volume da dispersão coloidal era reduzido para a remoção do solvente orgânico e concentração da nanoemulsão, ocorria a precipitação deste composto. Então, a

concentração do 7-NI foi reduzida para 500 µg/mL, sendo esta escolhida para os experimentos posteriores, visto que nesta condição não houve precipitação, nem perda visual do composto na etapa de filtração.

Ainda, diferentes óleos foram testados no desenvolvimento das nanoemulsões. O óleo de oliva não apresentou solubilidade adequada no álcool etílico. Assim, os óleos de triglicerídeo de cadeia média (TCM) e de rícino foram selecionados para a continuidade do trabalho.

Formulações sem o 7-NI (brancas) contendo 200, 300 e 500 mg dos óleos selecionados foram preparadas e caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e os resultados estão mostrados na Tabela 1. Como pode ser observado, sistemas nanométricos e monodispersos foram obtidos para ambos os óleos em todas as quantidades inicialmente testadas, visto que os valores de índice de polidispersão foram menores ou igual a 0,200. Entretanto, as nanoemulsões preparadas a partir do óleo de rícino apresentaram menores tamanhos. Ainda, para ambos os óleos, o tamanho das gotas aumentou com o aumento da quantidade inicial do óleo da formulação.

O potencial zeta é uma característica que resulta do balanço de cargas de moléculas presentes na interface das nanoemulsões, seja dos tensoativos, seja de outros compostos que se encontram adsorvidos às mesmas. Em geral, valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em módulo, são desejáveis para a estabilidade física das nanoemulsões, uma vez que a repulsão eletrostática tende a evitar possíveis agregações da fase interna (KLANG, BENITA, 1998). Nas condições testadas, as nanoemulsões apresentaram carga entre -25 e -33 mV, não parecendo haver diferença entre as formulações testadas (Tabela 1). A carga negativa pode ser atribuída à presença de lecitina, visto que em sua composição existe uma pequena percentagem de lipídeos carregados negativamente, principalmente de ácido fosfatídico (XU et al., 2013).

Tabela 1. Características físico-químicas das nanoemulsões brancas preparadas com TCM e óleo de rícino em diferentes quantidades iniciais. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M.

Quantidade de óleo (mg)	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
TCM			
200	214,7 \pm 18,8	0,112 \pm 0,01	-27,0 \pm 3,2
300	349,6 \pm 15,6	0,159 \pm 0,01	-25,0 \pm 0,6
500	432,4 \pm 37,8	0,201 \pm 0,02	-31,5 \pm 1,2
Rícino			
200	189,9 \pm 4,0	0,103 \pm 0,01	-32,8 \pm 2,9
300	194,7 \pm 2,5	0,104 \pm 0,04	-29,6 \pm 0,6
500	219,8 \pm 6,7	0,146 \pm 0,01	-27,1 \pm 2,8

Além do tamanho e potencial zeta, as nanoemulsões contendo 7-NI foram caracterizadas quanto ao teor, recuperação e eficiência de encapsulação do fármaco. Os resultados estão mostrados na Tabela 2. De modo similar às nanoemulsões brancas, sistemas nanométricos e monodispersos foram obtidos para ambos os óleos em todas as quantidades iniciais testadas. Os valores de potencial zeta também se situaram próximos a -30 mV. A adição do 7-NI nas formulações não pareceu afetar o diâmetro médio e potencial zeta das gotículas. Por outro lado, um aumento no teor de fármaco e, portanto, na recuperação percentual do mesmo pode ser observado com o aumento da quantidade de óleo das formulações. A eficiência de encapsulação que reflete a concentração de fármaco que está associada às gotículas, em relação a sua concentração total, atingiu valores máximos de cerca de 60%, indicando que parte do 7-NI encontra-se dissolvido da fase externa, possivelmente no interior de micelas de tensoativo.

Tabela 2. Características físico-químicas e de encapsulação obtidas para as nanoemulsões contendo 7-NI preparadas com TCM e óleo de rícino em diferentes quantidades iniciais. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M, à exceção dos resultados expressos em porcentagem, nestes os valores encontram-se como a média \pm D.P.R.

Quantidade de óleo (mg)	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Recuperação (%)	Eficiência de encapsulação (%)
TCM					
200	209,8 \pm 2,4	0,081 \pm 0,01	-27,0 \pm 0,4	46,7 \pm 10,9	38,5 \pm 10,7
300	292,8 \pm 2,9	0,154 \pm 0,03	-28,4 \pm 1,9	52,2 \pm 7,6	49,1 \pm 30,0
500	422,2 \pm 5,4	0,170 \pm 0,03	-26,8 \pm 0,8	86,0 \pm 9,8	51,4 \pm 8,0
Rícino					
200	188,03 \pm 3,2	0,078 \pm 0,01	-28,3 \pm 2,7	67,8 \pm 24,3	48,9 \pm 14,8
300	195,9 \pm 2,0	0,085 \pm 0,03	-29,9 \pm 0,8	82,2 \pm 2,8	59,5 \pm 11,2
500	232,7 \pm 3,7	0,136 \pm 0,03	-30,3 \pm 1,0	76,5 \pm 5,6	56,8 \pm 5,1

Com base nos resultados anteriores, o óleo de rícino foi selecionado para a preparação das nanoemulsões de 7-NI. Então, foi verificado se o aumento da quantidade de óleo melhoraria os parâmetros de teor e, principalmente, a eficiência de encapsulação do 7-NI nas nanoemulsões. Para isso, as quantidades de 300, 500, 700, 900 e 1000 mg de óleo foram testadas (Tabela 3). Os demais excipientes da formulação foram mantidos nas mesmas concentrações. Como pode ser observado, os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão aumentaram com o aumento da quantidade de óleo. Entretanto, para quantidades de óleo de rícino maiores que 900 e 1000 mg, duas populações de tamanho de partículas foram observadas, indicando que as concentrações dos surfactantes usadas não foram suficientes para emulsionar completamente o óleo. Além disso, os valores de teor e recuperação do 7-NI atingiram o máximo de cerca de 400 mg/mL e 80%, respectivamente, quando 700 mg de óleo de rícino foram adicionados à formulação. Este resultado mostrou que esta seria a quantidade máxima de óleo que poderia ser usada para a obtenção de nanoemulsões com características físico-químicas e de teor de fármaco adequadas.

Tabela 3. Características físico-químicas e de encapsulação obtidas para as nanoemulsões contendo 7-NI preparadas com óleo de rícino em diferentes quantidades iniciais. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M, à exceção dos resultados expressos em porcentagem, nestes os valores encontram-se como a média \pm D.P.R.

*amostras apresentaram segunda população de tamanho em escala micrométrica.

Quantidade de óleo (mg)	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Recuperação (%)	Eficiência de encapsulação (%)
300	181,4 \pm 3,8	0,081 \pm 0,010	-30,9 \pm 1,1	64,7 \pm 3,5	59,5 \pm 2,6
500	215,9 \pm 4,5	0,146 \pm 0,003	-26,6 \pm 0,3	58,9 \pm 5,5	66,0 \pm 5,6
700	236,6 \pm 2,3	0,203 \pm 0,002	-29,5 \pm 1,6	79,4 \pm 5,3	71,1 \pm 0,8
900*	236,0 \pm 4,5	0,219 \pm 0,003	-27,5 \pm 2,5	58,7 \pm 7,0	74,8 \pm 0,7
1000*	281,1 \pm 15,0	0,225 \pm 0,010	-29,9 \pm 0,8	73,6 \pm 13,0	83,5 \pm 7,4

4.2. Validação de metodologia analítica

4.2.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método analítico em medir com exatidão a resposta de um composto de interesse na presença dos demais componentes da amostra (ICH, 2005). Para determinar a especificidade do método, soluções obtidas a partir dos excipientes das formulações foram analisadas por CLAE e os cromatogramas foram comparados com aquele obtido para o 7-NI, analisado nas mesmas condições. Conforme mostrado na Figura 7, os constituintes da formulação não interferiram no cromatograma do 7-NI, indicando que o método é específico nas condições testadas.

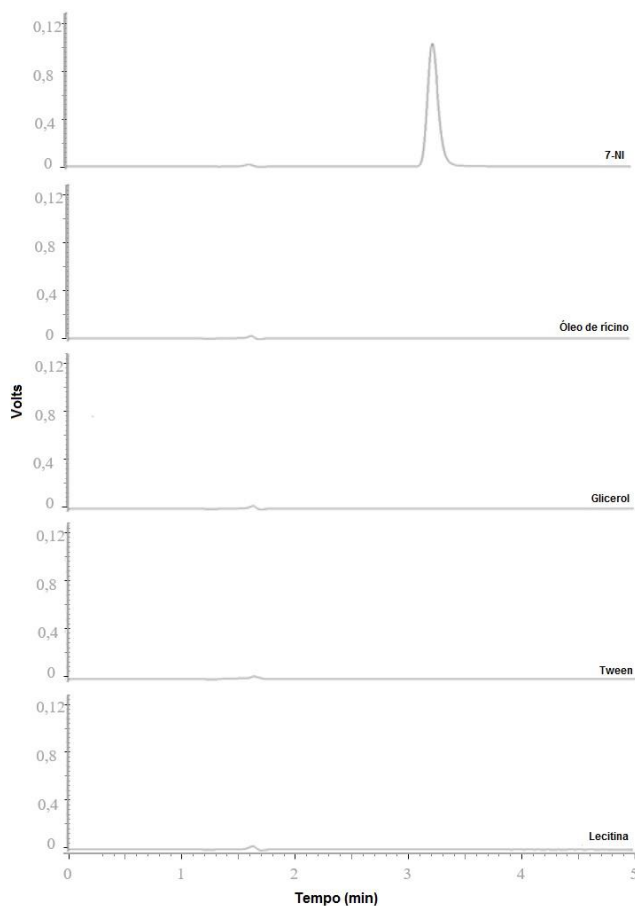


Figura 7. Cromatogramas do 7-NI e dos demais componentes da amostra, analisados nas mesmas condições.

4.2.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade do método foi testada no intervalo de concentração de 1,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$. Esta faixa de concentração foi selecionada visando obter um método com elevada sensibilidade, a fim de permitir a quantificação do 7-NI em pequenas concentrações nos sistemas nanoemulsionados. A

curva de calibração média obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,997 e a equação da reta $y = 55691x - 132561$, onde y é a área do pico do 7-NI e x é a sua concentração (Figura 8). Conforme estes resultados, o método cromatográfico desenvolvido mostrou ser linear na faixa de concentração testada (BRASIL, 2003)

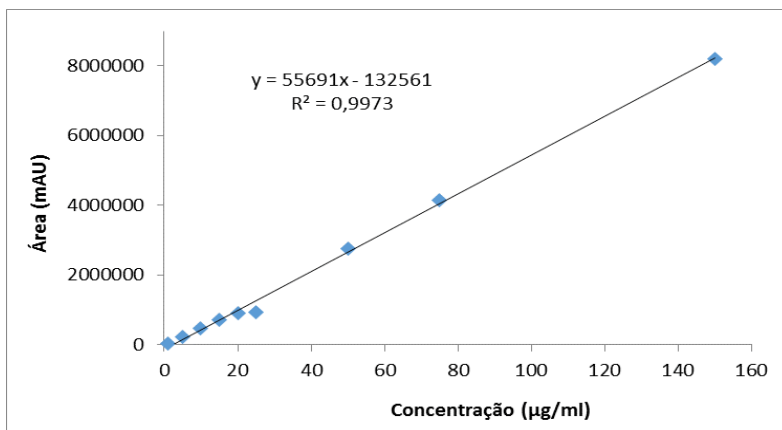


Figura 8. Representação gráfica da curva de calibração média do 7-NI obtida por CLAE com sua respectiva equação da reta e coeficiente de determinação.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada como valor exato. O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade do fármaco em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005). Os valores de limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do 7-NI foram de 0,07 µg/mL e LQ de 0,21 µg/mL, respectivamente. Estes valores indicaram que o método é suficientemente sensível para quantificar o 7-NI nas nanoemulsões.

4.2.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária. O ensaio de precisão intradia (repetibilidade) foi realizado em sextuplicata durante o mesmo dia, pelo mesmo analista. O ensaio de precisão intermediária (interdia), a amostra foi analisada em triplicata em três dias diferentes (Tabela 4). Considerando que para ambos os casos os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram menores que 5%, o método cromatográfico desenvolvido pode ser considerado preciso (Brasil, 2003).

Tabela 4. Dados da repetibilidade e da precisão intradia e interdias para o 7-NI.

interdias para 0,1% N=				
Amostra	Precisão intradia		Precisão interdias	
	Média (%)	DPR (%)	Média (%)	DPR (%)
n=3	98,8	0,32	99,2	1,73
	99,4		102,7	
	99,3		100,6	
Repetibilidade				
n=6	99,4		102,8	3,27
	94,6		95,8	
	100,2		101,5	

4.2.4. Exatidão

A exatidão do método indica a relação entre os resultados obtidos pelo método e o valor verdadeiro e não deve variar mais do que 15% (Brasil, 2003). Pode ser avaliada pela análise de amostras contendo quantidades conhecidas da substância estudada, sendo expressa como porcentagem de recuperação. Os resultados de recuperação obtidos encontram-se na Tabela 5. O método mostrou-se exato, como mostra os valores de percentual de recuperação do 7-NI na amostra testada.

Tabela 5. Valores obtidos na avaliação da exatidão do método cromatográfico.

Quantidade adicionada (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Concentração média encontrada (µg/mL)	Recuperação média (%)	DPR (%)
4,5 (80%)	12	12,53	112,53	2,51
7,5 (100%)	15	16,04	114,29	1,59
10,5 (120%)	18	18,23	102,39	0,38

4.3.3. Robustez

A robustez do método é a medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A robustez do método foi testada por meio de pequenas alterações nas seguintes condições analíticas: fluxo (mL/min), pH do tampão de fase móvel, composição da fase móvel e comprimento de onda (Tabela 6). Os valores de DPR (%) obtidos para os parâmetros analíticos analisados foram menores que 5%, indicando que o método é robusto.

Tabela 6. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise do 7-NI

Variável	Faixa investigada	Teor (%)	DPR (%)
Fluxo (mL/min)	0,9	100,17	0,41
	1,1	100,17	0,05
pH do tampão	7,9	100,30	0,14
	8,1	100,07	0,14
Proporção da fase móvel (acetonitrila:tampão)	48:52	99,96	0,18
	52:48	100,49	0,01
Comprimento de onda (nm)	358	99,70	0,41
	362	100,18	0,10

4.3. Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram conduzidos utilizando a formulação de nanoemulsão contendo 7-NI preparada com 700 mg de óleo de rícino. Esta formulação apresentava tamanho médio e potencial zeta de 240 nm e -28,5 mV, respectivamente. Para avaliação da estabilidade física da nanoemulsão, os parâmetros de tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta foram avaliados no período de 30 dias, após armazenamento das formulações na temperatura de 25 °C e em geladeira (4 °C) e após exposição à luz UV. Os resultados são mostrados na Figura 9. Como pode ser observado, o tamanho e índice de polidispersão não se mostraram alterados no período avaliado, após armazenamento das formulações a 25 °C e em geladeira (4 °C). Entretanto, estes parâmetros aumentaram consideravelmente após exposição da formulação à luz UV. Alterações no potencial zeta das formulações foram observadas neste período, para todas as condições testadas. Entretanto, dada à variabilidade da medida, estes resultados não parecem ser indicativos de estabilidade.

O teor de 7-NI também foi avaliado no mesmo período. Conforme observado na figura 10, ocorreu uma redução significativa no teor de 7-NI para todas as condições testadas, após 30 dias de armazenamento. Entretanto, a redução do teor de 7-NI foi significativamente maior quando a formulação foi exposta à luz UV, alcançando mais de 80% de degradação no período avaliado. Estes resultados claramente mostram que o 7-NI é instável frente à luz, mesmo na forma de nanoemulsão, e que estratégias farmacotécnicas devem ser ainda testadas a fim de melhorar a estabilidade das formulações, como por exemplo, adição de agentes antioxidantes e armazenamento em frascos âmbar. A aparência das amostras ao final do experimento pode ser vista na Figura 11.

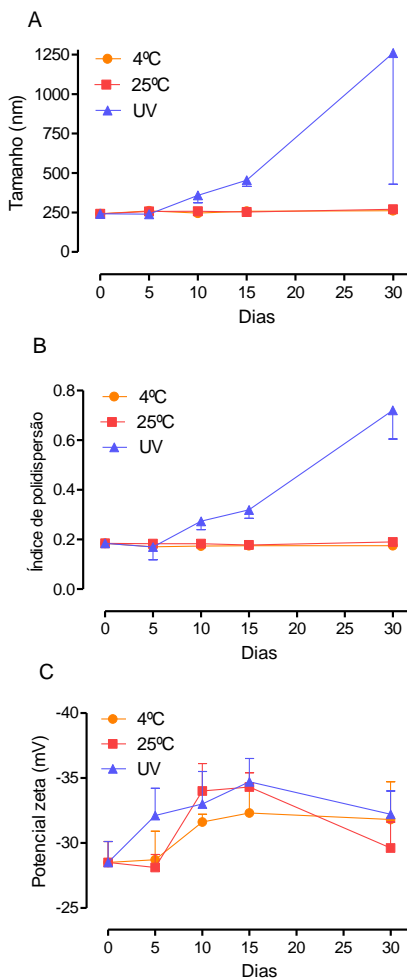


Figura 9. Parâmetros avaliados no estudo de estabilidade das NE 7-NI frente a temperatura (4°C e 25°C) e a luz UV ao longo de 30 dias. Foram feitas avaliações de tamanho (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C) nos 0, 5, 10, 15 e 30. Os dados representam a média \pm E.P.M.

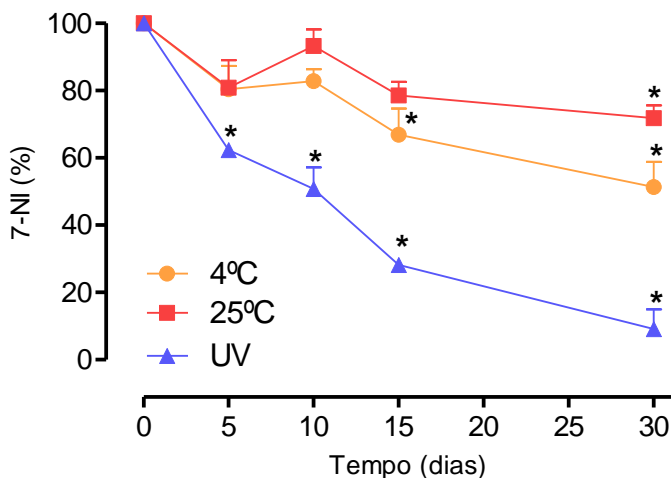


Figura 10. Cinética de degradação 7-NI contido nas na nanoemulsão. A estabilidade frente a temperatura (4°C e 25°C) e a luz UV foi avaliada ao longo de 30 dias. Os testes foram feitos nos dias 0, 5, 10, 15 e 30. Os dados representam a média \pm D.P.R. As medidas ao longo do tempo foram comparadas à avaliação no tempo 0 (100%) usando ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0.

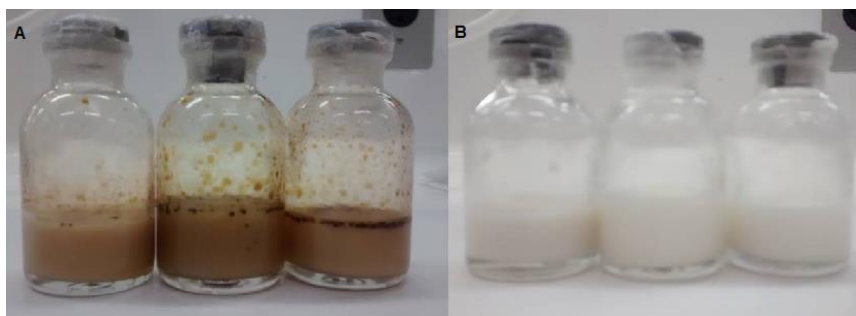


Figura 11. Aparência das nanoemulsões de 7-NI no dia 30 do teste de estabilidade. Em A, as amostras mantidas sob luz UV. Em B, as amostras protegidas da luz.

PARTE II

5. OBJETIVO

Validar o efeito inibitório da nanoemulsão de 7-NI sobre a NOS-1 em i) cultura de células de linhagem de macrófagos J774 e músculo liso vascular A7r5, ii) tecido de aorta e músculo esquelético e iii) em modelos de sepse, comparativamente ao composto livre.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MATERIAIS

Lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli* B4 (LPS), tripsina, meio de montagem aquoso Gel-Mount®, diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA) obtido da Invitrogen Corporation (EUA), dimetil-sulfóxido (DMSO), Interferon- γ recombinante de rato (IFN) obtido da PeproTech EC (UK), meio de cultura *Minimal Essential Medium* modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) obtidos da GIBCO/Invitrogen Corporation (EUA) e Cultilab (Brasil), cetamina e xilasina da Syntec (Brasil), tramadol adquirido da Teuto (Brasil), isoflurano da Cristália (Brasil), PBS estéril (em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 10,8; pH 7,4), solução de Hanks modificado obtido da Sigma Aldrich (EUA), poli-L-lisina da Sigma Aldrich (USA), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), sulfanilamida 1%, α -naftil-etilenodiamina 0,1%.

6.1.1. Cultura de células

Foram utilizadas duas linhagens celulares. A primeira foi de macrófagos J774 obtidos do Banco de Células da UFRJ e são macrófagos leucêmicos de camundongos BALB/C. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10 mM de HEPES; pH 7,4 (DMEM completo) e

mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas até a 8ª passagem e os repiques realizados aproximadamente a cada 3 dias, tempo para as células tornarem-se confluentes. Os repiques das células foram feitos por raspagem da placa de Petri, utilizando 2 ml de meio DMEM. As células eram transferidas para tubo plástico tipo Falcon e centrifugadas por 7 minutos (centrífuga Daiki, DT 4.500 - 250 g) à temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o pellet ressuspensão em 1 mL de DMEM completo.

A segunda linhagem usada foi de células de músculo liso vascular de aorta de rato A7r5 (ATCCs CRL-1444), adquiridas no Banco de Células da UFRJ. As células foram cultivadas da maneira descrita acima. Os repiques deram-se pela remoção do meio de cultura e a lavagem dos frascos com PBS estéril pré-aquecido. Após a remoção do PBS, cada frasco recebeu 4 mL de solução de tripsina (0,25% v/v) /EDTA (0,03% v/v) pré-aquecida a 37°C. Após 2-3 minutos as células foram transferidas para tubo plástico tipo Falcon contendo 6 ml de DMEM completo e centrifugadas por 7 minutos à temperatura ambiente (250 g). O sobrenadante era descartado e o pellet ressuspensão em 1 mL de DMEM completo.

As células foram contadas e distribuídas em placas de 96 poços para os protocolos experimentais.

6.1.2. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar pesando entre 200 e 250 g e camundongos Swiss pesando entre 45 e 50 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em local com temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C) e ciclo de 12 horas de luz claro/escuro, com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC (CEUA/UFSC) sob o Protocolo PP790.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Avaliação indireta da produção de NO

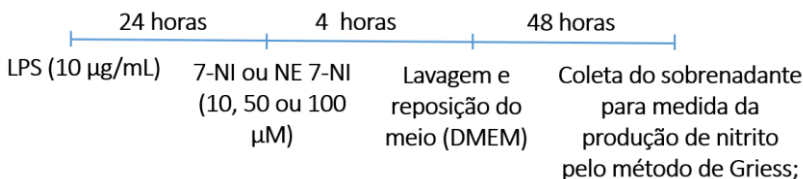
A produção de NO foi avaliada de forma indireta, pela quantificação do acúmulo de nitrito (um dos metabólitos estáveis do NO) no sobrenadante da cultura celular de macrófago J774 e células musculares lisas A7r5.

Macrófagos são ativados quando estimulados com LPS (Nathan & Hibbs Jr, 1991), assim, incubamos macrófagos J774 por 24 horas com LPS (10 µg/ml), com o intuito de ativar as células a expressar a NOS-2 e produzir NO. Após ativação, o sobrenadante foi descartado e o inibidor livre (7-NI) ou encapsulado (NE 7-NI) nas concentrações de 10 µM, 50 µM e 100 µM foi adicionado aos poços e mantidos por 4 horas. Então, as células foram lavadas com Hanks, para remoção completa do inibidor e mantidas em meio de cultura. Quarenta e oito horas depois, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de nitrito.

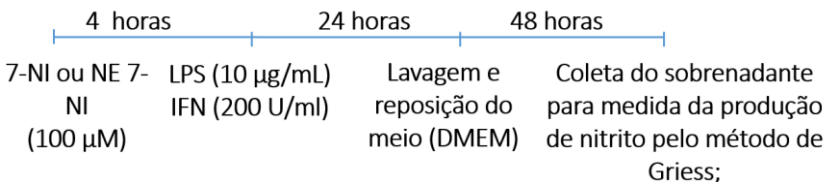
A avaliação foi realizada através da reação de Griess, na qual o reagente é composto de uma parte de sulfanilamida 1% (v/v em água) e uma parte de α -naftil-etilenodiamina 0,1% (v/v em ácido fosfórico 5%), misturados na proporção de 1:1 no momento do uso. A determinação é baseada na reação do nitrito com a sulfanilamida, com posterior acoplamento deste produto com a α -naftil-etilenodiamina, resultando em um composto que absorve luz na faixa de 540 a 570 nm.

Um volume de 100 µL do sobrenadante da cultura celular e 100 µL do reagente de Griess foram pipetados em placa de 96 poços totalizando 200 µL por poço. Depois de 10 minutos de estabilização da reação, as placas foram lidas em leitor de placas no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de nitrito foi pipetada (triplicata) e lida simultaneamente. Os valores de absorbância do experimento foram interpolados com os valores da curva padrão no programa GraphPad Prism®, obtendo-se as quantidades de nitrito produzidas pelas células durante o experimento em µM. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

O protocolo experimental utilizado nos macrófagos J774 se deu da seguinte maneira:



Já o protocolo do experimento que utilizou células musculares lisas A7r5 foi delineado como mostrado na sequência:



6.2.2. Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de avaliação da viabilidade celular, descrito por Mosmann (1983), é um método colorimétrico. Utiliza a capacidade de desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis converterem o sal de dimetiltiazol (MTT), solúvel em água, no cristal formazan, insolúvel em água. O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar de maneira indireta a viabilidade celular após o término dos experimentos de detecção de nitrito, a fim de avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos compostos utilizados.

Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados aos poços 190 µL de DMEM completo contendo 10 µL de uma solução de MTT 5 mg/mL. As células foram incubadas com esta solução em estufa de CO₂ a 37°C, por 3 horas. Após incubação, o sobrenadante foi removido e os poços preenchidos com 200 µL de DMSO para dissolver os cristais de formazan. Fez-se a leitura em leitor de placas em comprimento de onda de 540 nm e o cálculo da porcentagem de células viáveis foi feito em relação ao grupo controle do experimento.

6.2.3. Avaliação direta da produção de NO: sonda fluorescente DAF-FM DA

A produção de NO foi avaliada de maneira direta através da sonda fluorescente DAF-FM DA. Esta sonda, desenvolvida por Kojima e colaboradores (1999), atravessa a membrana celular de maneira passiva e dentro da célula é desacetilada por esterases, gerando DAF-FM. O DAF-FM reage com o NO, produzindo um benzotriazol fluorescente, permitindo a obtenção de relação linear entre a intensidade de fluorescência e a formação de NO na amostra. A sonda é capaz de detectar concentrações de NO a partir de 3 nM (Kojima et al., 1999).

A produção de NO foi avaliada em cortes de aorta e de músculo esquelético (extensor digital longo traseiro; EDL) de ratas Wistar. Fragmentos de aorta (com o endotélio removido) e tecido muscular esquelético foram coletados, acondicionados em embalagem contendo Tissue-Tek® e, imediatamente colocados a -20°C, para congelamento. Após total congelamento, foram levadas para freezer -80°C para conservação até sua utilização. No dia do experimento, as amostras foram seccionadas em fatias de espessura de 16 µm, utilizando criostato Leica CM 1850 UV a -22° e fixadas em lâminas cobertas com poli-L-lisina. Então, foram mantidas em solução de Hanks durante 30 minutos a temperatura ambiente para estabilização. Depois os cortes foram incubados com 7-NI ou NE 7-NI nas concentrações de 1 µM, 10 µM e 100 µM ou, no caso dos controles, em Hanks pelo tempo de 2 horas. Após, os cortes foram lavados com Hanks e então, incubados durante 1 hora com a sonda DAF-FM DA (5 µM). Foram novamente lavadas para remoção da sonda, preparadas com meio de montagem aquoso Gel-Mount®, e levadas para leitura em microscópio de fluorescência (Leica DMI 3000B), em comprimento de onda de excitação e emissão de 495 e 515, respectivamente. Os cortes foram feitos em duplicata, e cada corte foi fotografado em 7 diferentes pontos. A quantificação da intensidade de fluorescência relativa foi realizada com o *software* de domínio público Image J.

6.2.4. Indução de sepse por cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e por inoculação de bactéria via pulmonar

No protocolo do modelo de CLP, ratas Wistar foram pré-anestesiadas com tramadol (10 mg/kg) e xilasina (5 mg/kg) e anestesiadas com isoflurano (5% para indução e 2,5% para manutenção). Procedeu-se a laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm, seguida de exposição e ligadura não obstrutiva do ceco, inferior à válvula íleocecal. Para indução da septicemia, fez-se uma perfuração transfixante no ceco com agulha 14 G, seguida de compressão para promover a saída de conteúdo intestinal. Após a sutura, os animais receberam PBS (30 mL/kg, s.c. ~37°C) para reposição fluídica e foram, então, mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (Rittirsch et al., 2008). Como protocolo analgésico, foi utilizado tramadol (10 mg/kg) a cada 12 horas nas 48 horas após a cirurgia.

Para a indução da sepse pela inoculação de bactéria pela via pulmonar (pneumosepse), foram utilizados camundongos Swiss. Antes do experimento, uma alíquota de bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi descongelada e lavada por duas vezes em PBS estéril e incubada em caldo BHI por 18 h a 37°C. O caldo foi centrifugado e o pellet resultante foi lavado 2 vezes e ressuspenso em 0,5 mL de PBS estéril. A determinação da concentração de bactérias se deu pela interpolação da medida da absorbância em 600 nm na regressão previamente obtida. A suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril na concentração de 10⁹ bactérias por alíquota de 50 microlitros para inoculação. Os animais foram anestesiados com uma mistura de tribromoetanol e cetamina (375 / 25 mg/kg; i.p.) e colocados em posição supina. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 5 mm na pele da região ventral do pescoço. A musculatura foi afastada para a identificação da traqueia para injeção intratraqueal de 0,05 mL da suspensão de bactérias, feita com o auxílio de agulha 30 G. A pele foi suturada e os animais

receberam PBS (30 mL/kg; s.c. ~37°C) para reposição de fluidos. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (~30 a 45 min).

6.2.5. Curva de sobrevivência

Os animais foram pré-tratados com 7-NI ou com NE 7-NI uma hora antes da indução da sepse por CLP ou pneumosepse e então foram avaliadas as curvas de sobrevivência.

As curvas de sobrevivência foram expressas como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de 12 horas durante os dias de avaliação (quatro dias de avaliação para o CLP; cinco dias de avaliação para a pneumosepse).

6.2.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos de maneira singular para cada protocolo experimental e as análises estatísticas foram realizadas por teste T ou análise de variância (ANOVA), de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para a análise de viabilidade celular (%), os valores são expressos como a média \pm D.P.R, que representa o desvio-padrão expresso como porcentagem da média, nos demais experimentos os valores são expressos como a médias \pm E.P.M. Para análise estatística das curvas de mortalidade e cálculo da média foi utilizado o teste de Log-rank. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, sendo todos os testes estatísticos realizados com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA).

7. RESULTADOS

7.1. Efeito do 7-NI livre e nanoencapsulado na produção de NO em macrófagos e células musculares lisas

Como pode ser visto na Figura 12, macrófagos ativados produzem NO, o qual, embora não mostrado aqui, é essencialmente resultante da atividade da isoforma NOS-2. Depois de 24 horas de ativação, quando se tem altos níveis da

NOS-2 já expressa, a adição de 7-NI livre não afeta a produção de nitrito. Por outro lado, a forma nanoencapsulada do inibidor foi capaz de causar uma inibição da ordem de 30% na produção de nitrito, embora sem obedecer à uma curva dose-resposta.

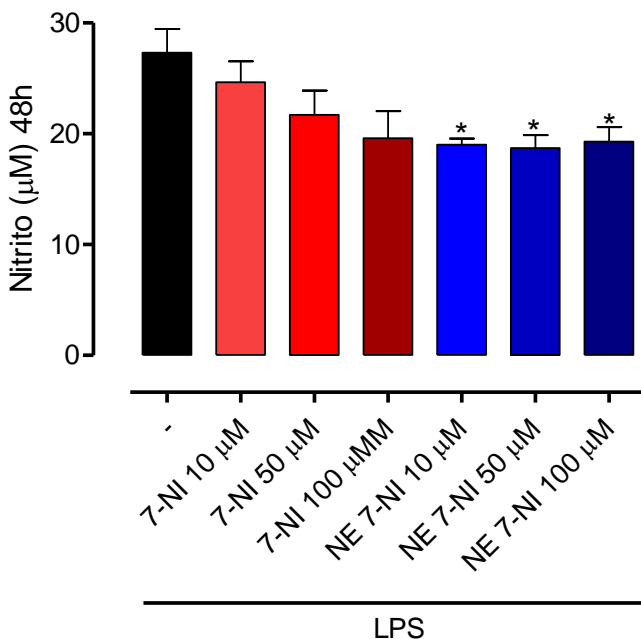


Figura 12. Produção de nitrito em cultura de macrófagos J774. Após plaqueamento de 4×10^4 células/poço e adesão por 12 horas, os macrófagos foram ativados por LPS B4 na concentração de 10 µg/ml durante 24 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas por 4 horas com 7-NI livre ou NE 7-NI nas concentrações indicadas e então lavadas. Meio fresco foi adicionado aos poços e a concentração de nitrito do sobrenadante foi avaliada 48 horas após a retirada do inibidor nas duas formas. Os dados representam a média \pm E.P.M. de triplicatas. ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni.

Como mostrado por Connelly et al., 2005 para a NOS-3 e por Scheschowitsch et al., 2015 para a NOS-1, as NOS constitutivas, principalmente a NOS-1, são elementos fundamentais na sinalização de vários eventos, entre eles a expressão da NOS-2. Assim, utilizamos células A7r5, que possuem tanto a NOS-1 quanto a NOS-3 expressas constitutivamente, para avaliar se a inibição da NOS-1 pelas formas livre e nanoencapsulada do 7-NI teria impacto sobre a expressão da NOS-2 e a consequente produção de NO. As células foram incubadas com NE 7-NI e com 7-NI por quatro horas, que foram removidos antes da ativação com LPS/IFN. Como resultado obtivemos inibição na produção do nitrito apenas pela NE 7-NI (Figura 13).

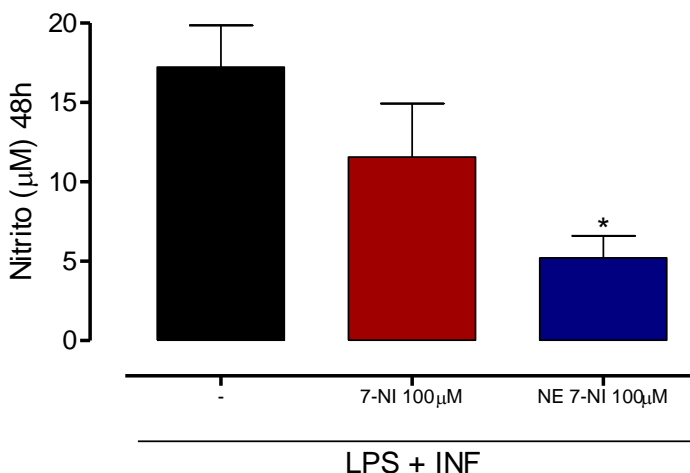


Figura 13. Produção de nitrito por células de músculo liso A7r5. Após plaqueamento de 4×10^4 células/poço e adesão por 12 horas, as células A7r5 foram incubadas com 7-NI ou NE 7-NI por 4 horas e lavadas. Foram então ativadas com LPS (10 µg/ml) e IFN (200 U/ml). Após 48 horas, o sobrenadante foi removido e a concentração de nitrito do sobrenadante avaliada. Os dados representam a média \pm E.P.M. de triplicatas. Os valores foram comparados com as células ativadas usando o teste *t* de Student.

7.2. Avaliação da viabilidade celular

Com o objetivo de verificar se o inibidor livre ou encapsulado estaria afetando a viabilidade celular, ao final dos experimentos de mensuração do nitrito, avaliamos a viabilidade celular pelo método do MTT. A incubação com o 7-NI ou com a NE 7-NI não afetou a viabilidade celular de macrófago J774 nem das células musculares lisas A7r5 (Figura 14).

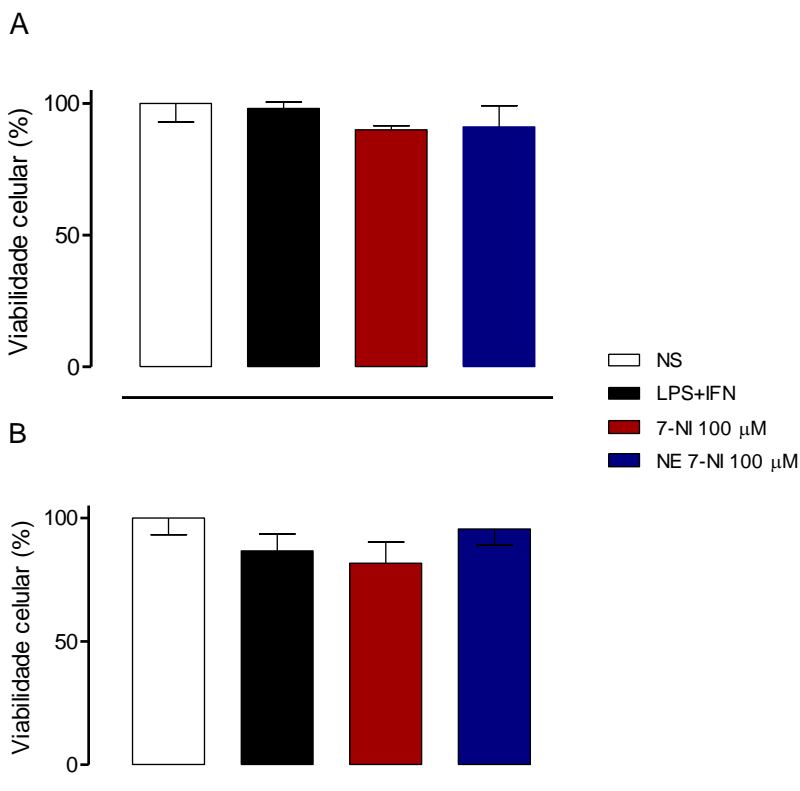


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular. Ao final dos experimentos de dosagem de nitrito, a viabilidade dos macrófagos (A) e das células de músculo liso A7r5 (B) foi avaliada. As células foram incubadas com solução de MTT (5

mg/mL) por 3 horas, posteriormente o sobrenadante foi descartado e a camada de células lisada com DMSO por 15 minutos e a leitura feita em 540 nm. Os dados foram expressos em porcentagem em relação às células não estimuladas (NS). O valor do grupo controle (NS) foi considerado como 100% de proliferação mitocondrial. Médias \pm D.P.R.; ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni.

7.3. Mensuração da produção de NO por sonda fluorescente em cortes de aorta e músculo esquelético

O passo seguinte foi investigar a ação das duas formas do inibidor usando preparações *ex-vivo*, tecido muscular esquelético (EDL) e aorta. Esses tecidos foram escolhidos por expressar constitutivamente a NOS-1, permitindo uma melhor avaliação em relação à seletividade do composto na inibição da produção do NO.

A Figura 15 mostra fotografias de cortes de aorta incubadas ou não com o inibidor. A fluorescência do grupo controle traduz a atividade de NOS constitutivas, mais provavelmente a NOS-1. Na presença de concentrações crescentes das duas formas do inibidor, vê-se que a fluorescência é reduzida de forma dose-dependente. Igual resultado foi visto em cortes de musculatura esquelética (Figura 16). A Figura 17 mostra a quantificação da fluorescência presente nos cortes, evidenciando que ambas as preparações diminuíram de forma dose-dependente a atividade da NOS-1 nos dois tecidos.

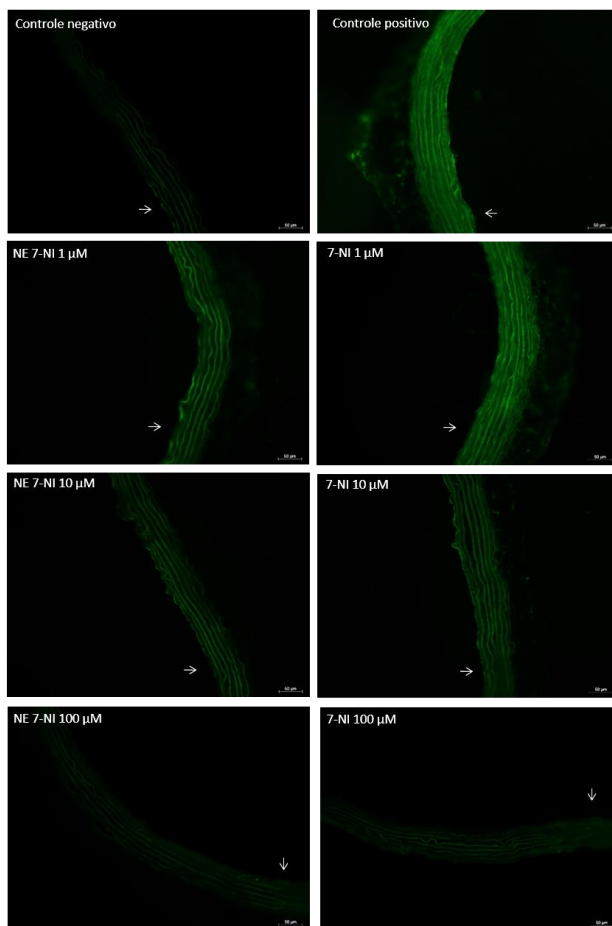


Figura 15. Imagens representativas da produção de NO em cortes de aorta. Cortes transversais de aorta (16 μm) foram incubados com concentrações de 1 μM, 10 μM e 100 μM de 7-NI ou NE 7-NI por 2 horas. Após, foram lavados e incubados com a sonda DAF-FM DA por uma hora, novamente lavados e analisados em microscópio de fluorescência. Aumento de 200x. As barras brancas representam escala de 50 μm. As setas brancas indicam a luz do vaso. Para facilitar a visualização, todas as fotos tiveram seu brilho aumentado em 30%.

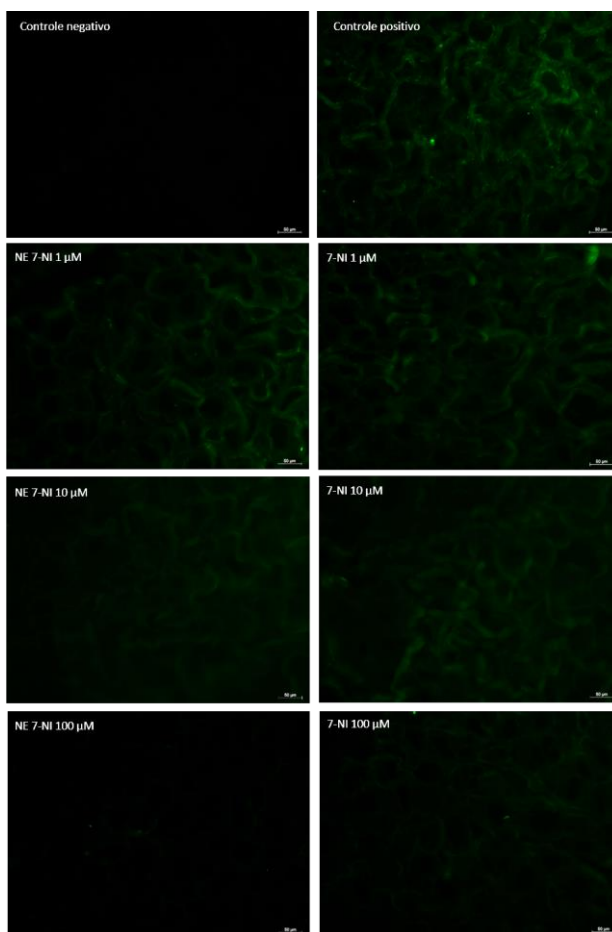


Figura 16. Imagens representativas da produção de NO em cortes de músculo esquelético. Cortes transversais do músculo extensor longo dos dedos (EDL; 16 μ m) foram incubados com concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M de 7-NI ou NE 7-NI por 2 horas. Após, foram lavados e incubados com a sonda DAF-FM DA por uma hora, novamente lavados e analisados em microscópio de fluorescência. Aumento de 200x. As barras brancas representam escala de 50 μ m. Para facilitar a visualização, todas as fotos tiveram seu brilho aumentado em 60%.

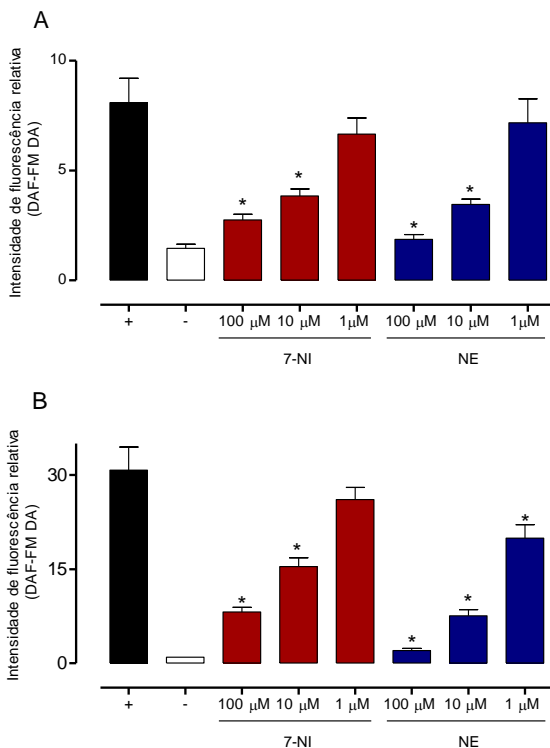


Figura 17. Quantificação da inibição na produção de NO pelo 7-NI e NE 7-NI em cortes de aorta e músculo esquelético. A quantificação foi realizada com o software de domínio público Image J. Painei A: aorta. Painei B: músculo esquelético. Cada barra representa a quantificação da intensidade de fluorescência de pelo menos 4 cortes distintos, sendo cada um feito em duplicata. O controle negativo (-) se refere às amostras não incubadas com a sonda, enquanto que o controle positivo (+) representa as amostras incubadas com a sonda, mas sem incubação prévia com inibidor. A quantificação foi realizada com o software de domínio público Image J. ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo; $n = 4$ a 5 .

7.4. Curvas de sobrevivência

Visto que a NOS-1 tem importância no gatilho da resposta inflamatória e no dano da integridade vascular da sepse e, também, que o 7-NI quando administrado previamente à indução da sepse mostrou prevenir a mortalidade (Duma et al., 2011; Scheschowitsch et al., 2015), nós testamos as NE 7-NI em dois modelos de sepse, no modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e no modelo de pneumosepse. As NE 7-NI ou 7-NI foram administrados (s.c.) 1 hora antes da indução da sepse.

A NE 7-NI mostrou prevenir em 40% a mortalidade de animais sépticos no modelo de CLP, tendo ação semelhante ao composto livre (Figura 18). No modelo de sepse por pneumonia, a NE 7-NI também preveniu em 40% a mortalidade, diferentemente do 7-NI, o qual não mostrou nenhum efeito benéfico ao final dos 5 dias de análise (Figura 19).

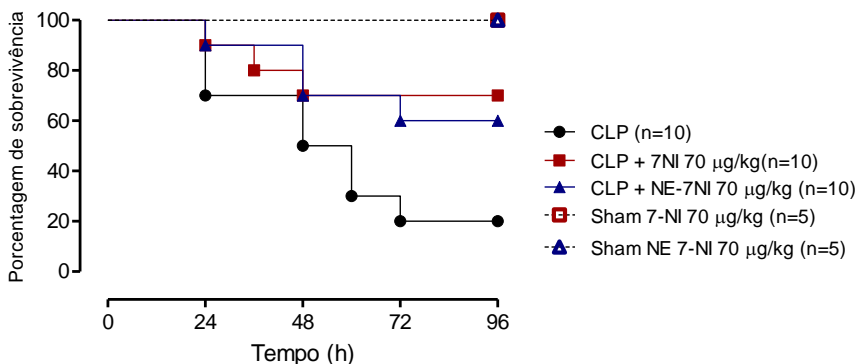


Figura 18. Efeito do 7-NI e da nanoemulsão de 7-NI na sobrevida de ratos sépticos pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Os animais foram tratados com 7-NI ou nanoemulsão de 7-NI (70 µg/Kg, s.c.) uma hora antes do CLP. Em ambos os grupos a sobrevivência foi avaliada ao longo de 96 horas. Log-rank (Mantel-Cox).

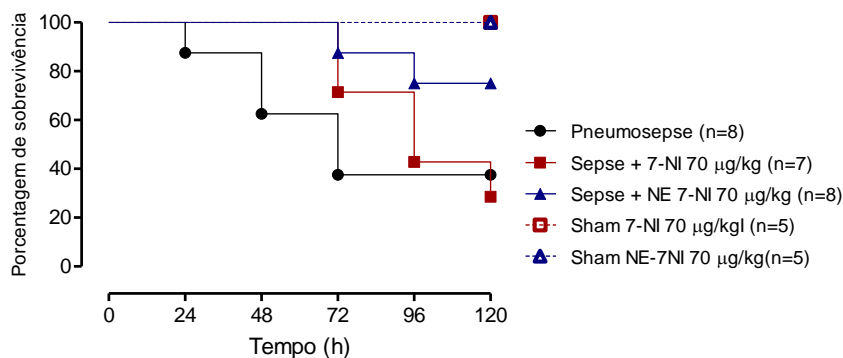


Figura 19. Efeito do 7-NI e da nanoemulsão de 7-NI na sobrevida de camundongos com sepse induzida por pneumonia. Os animais foram tratados com 7-NI ou nanoemulsão de 7-NI (70 µg/Kg, sc.) uma hora antes da indução da sepse por pneumonia. Em ambos os grupos a sobrevivência foi avaliada ao longo de 120 horas. Log-rank (Mantel-Cox).

8. DISCUSSÃO

O 7-NI é utilizado como ferramenta farmacológica no estudo de vários modelos de condições patológicas em que há aumento da produção do NO proveniente da NOS-1, como isquemia (O'Neill et al., 1996), doença de Parkinson (Yuste et al., 2012) dor (Moore et al., 1993) e sepse (Nardi et al., 2014). O composto inibe de maneira seletiva (*in vivo*) a isoforma neuronal da NOS (Babbedge et al., 1993; Moore et al., 1993). Porém, apresenta um tempo de meia vida curto, o que pode limitar sua utilização (Bush & Pollack, 2000). Assim, neste trabalho desenvolvemos uma formulação nanométrica do tipo nanoemulsão com o objetivo de melhorar parâmetros de meia-vida e biodisponibilidade do composto e testamos a sua ação comparativamente ao 7-NI livre.

Fármacos lipofílicos, como o 7-NI, são solubilizados preferencialmente em nanoemulsões o/a. Escolher uma composição adequada é fundamental para a obtenção de nanoemulsões estáveis, sendo a solubilidade do composto ao demais constituintes da formulação um fator determinante (Azeem et al., 2009). Para a escolha dos componentes da nanoemulsão utilizada neste trabalho, começamos testando a solubilidade de três óleos (óleo de rícino, MCT e de oliva) frente ao solvente orgânico álcool etílico, que foi previamente selecionado em virtude tanto de solubilizar o 7-NI quanto por ser solúvel em água, visto que na técnica escolhida, de emulsificação espontânea, a principal propriedade para a escolha do solvente é sua miscibilidade na fase aquosa. O método de emulsificação espontânea foi escolhido por ser simples, de fácil execução e por levar à formação de sistemas monodispersos e estáveis (Bouchemal, 2004). As nanoemulsões que apresentaram melhores parâmetros de tamanho e eficiência de encapsulação foram aquelas formuladas com óleo de rícino.

Nanoemulsões apresentam diâmetros que podem variar de 50 a 500 nm e são capazes de carrear grande quantidade de fármacos lipofílicos, além de protege-los de hidrólise e degradação enzimática (Lovelyn & Attama, 2011). Obtivemos NE 7-NI com diâmetro de aproximadamente 200 nm, que apresentaram pouca variação de tamanho (índice de

polidispersão menor que 0,2). Porém, a eficiência de encapsulação foi de 56,8%, ou seja, pouco mais que a metade da quantidade de 7-NI adicionada ao sistema estava inserida nas gotículas nanoemulsionadas. Então, variamos a quantidade de óleo a fim de melhorar este parâmetro. Pudemos notar que a eficiência de encapsulação melhorou conforme o aumento da quantidade de óleo. No entanto, nas maiores quantidades testadas (900 e 1000 mg), houve grande variação de tamanho e distribuição plurimodal, indicativo de baixa estabilidade. Assim, obtivemos a formulação de escolha utilizando 700 mg de óleo de rícino, com eficiência de 71,1% de encapsulação do 7-NI, distribuição unimodal e baixo índice de polidispersão.

Os parâmetros de teor e eficiência de encapsulação do 7-NI contido nas nanoemulsões foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, através de método desenvolvido e validado a partir do trabalho de Bush e Pollack (2000). Os experimentos de validação são sugeridos pelas autoridades reguladoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o *Food and Drug Administration* (FDA) (BRASIL, 2003; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). As metodologias cromatográficas são muito utilizadas para quantificação de fármacos nas mais diversas formulações, em estudos de estabilidade, de dissolução e em matrizes biológicas. Envolvem etapas de teste e otimização de condições, sendo a validação necessária para demonstrar experimentalmente que o método atende às exigências das suas aplicações analíticas e que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis (BRASIL, 2003). Leva em consideração a análise de critérios pré-determinados, os quais incluem precisão, exatidão, linearidade, especificidade e robustez. O método atendeu a todas as exigências para determinar de maneira segura e eficiente a quantidade de 7-NI.

O tamanho e índice de polidispersão e o potencial zeta foram medidos pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmica e anemometria laser-Doppler, respectivamente. O potencial zeta representa a carga de superfície do sistema, está relacionado com a interação das gotículas entre si e com o meio em que se encontram. Um potencial zeta maior que 30 mV ou menor que -30 mV proporciona repulsão eletrostática, com a manutenção da

estabilidade coloidal (Cho, 2013). As NE 7-NI apresentaram potencial zeta adequado, próximo a -30 mV. A carga negativa foi devida à presença dos fosfolipídios da lecitina, utilizada como emulsificante de fase orgânica (Heurtault et al., 2003).

O próximo passo foi investigar a estabilidade do composto e do sistema nanoemulsionado, visto que na literatura não existem informações precisas quanto à estabilidade do 7-NI. O que se sabe é que, em geral, indazóis são altamente degradados quando expostos à luz, com meia vida de degradação de 0,3 dia em meio aquoso (Janssen et al., 2015).

A estabilidade do sistema se deve à soma das forças de atração, pelas interações de van der Waals e forças elétricas repulsivas que existem entre gotículas, à medida que se aproximam umas das outras, devido aos movimentos Brownianos (Yu & Xie, 2013). A perda de estabilidade do sistema pode ser avaliada pela agregação das gotículas, que leva ao aumento e variação de tamanho. As principais causas de instabilidade de nanoemulsões são a coalescência e a maturação de Ostwald, processo que ocorre devido à diferença de potencial químico do material dentro das gotículas ou pela redução de energia livre do sistema ocasionando a migração dos glóbulos pequenos para o interior dos maiores (Taylor, 1998). O resultado do estudo de estabilidade mostrou que as amostras de NE 7-NI mantidas protegidas da luz apresentaram maior estabilidade do que aquelas mantidas sob luz ultravioleta. Nestas, houve fotodegradação do composto já no primeiro dia de avaliação (dia 5), além de aumento contínuo da agregação das gotículas, que se apresentaram micrométricas ao final dos 30 dias de avaliação. Porém, se compararmos com a fotodegradação de indazóis em meio aquoso, houve um retardo na degradação, visto que em nosso estudo a meia vida de degradação foi próxima ao 10º dia de armazenamento. O estudo de fotodegradação apresenta a limitação de ter sido desenvolvido em câmara de luz UV sem o controle de lux/hora, mas nos forneceu um panorama geral da fotodegradação do 7-NI contido no sistema.

As NE 7-NI não apresentaram alterações físicas quando armazenadas em ausência de luz nos 30 dias. Porém, nas amostras mantidas em temperatura ambiente (25°C) o composto

teve algum nível de degradação no último dia de análise (dia 30), enquanto que nas amostras mantidas à 4°C, houve degradação química significativa no 15º dia. Isto sugere que temperatura não influencia de maneira importante na estabilidade do sistema nem na estabilidade química do composto, uma vez que ao final dos 30 dias de análise, tanto as amostras mantidas à 4°C quanto aquelas mantidas à 25°C apresentaram o mesmo nível de degradação (sem diferença estatística entre as temperaturas).

Tendo feita caracterização da nanoemulsão, passamos aos ensaios visando avaliar suas características farmacológicas. Inicialmente, testamos a atividade da nanoemulsão comparativamente com a do 7-NI livre sobre a produção do nitrito de macrófagos J774 ativados com LPS. O resultado mostra que, em conformidade com relatos da literatura (Alderton et al., 2001), o 7-NI *in vitro* não exibe a alta seletividade observada *in vivo* para a isoforma NOS-1. Do ponto de vista da atividade da nanoemulsão, este resultado sugere que o nanoencapsulamento do 7-NI causa uma inibição prolongada da NOS-2 de macrófagos J774. Uma possibilidade para explicar a inibição parcial seria o fato da quantidade de 7-NI que sai da nanoemulsão captada pelo macrófago ser pequena ao longo do tempo e contrabalançada pela meia-vida curta do composto. Dessa maneira, não seria possível chegar à uma concentração de 7-NI alta o suficiente para causar uma inibição maior na produção de NO. Outra possibilidade seria a influência das características de tamanho e carga da nanoemulsão. Isso porque emulsões submicrométricas e com carga negativa demoram mais a serem capturadas pelo sistema fagocítico (Pratten & Lloyd, 1985; Devalapally et al., 2013), o que poderia explicar o perfil de inibição da NOS-2 pela NE 7-NI, pois apenas uma pequena quantidade seria captada pelas células nas 4 horas de incubação, inibindo de maneira parcial a atividade enzimática.

Então avaliamos, em células de músculo liso A7r5, se a inibição das NOS constitutivas pela NE 7-NI e sua forma livre interferiria na expressão e consequentemente na produção de NO pela NOS-2, uma vez que já está descrito um *cross-talk* entre as isoformas (Persichini et al., 2006) e importante papel da NOS-1 na sinalização da expressão da NOS-2, através da translocação nuclear do NF-κB (Scheschowitsch et al., 2015). O

resultado obtido aponta que a inibição das NOS constitutivas pela NE 7-NI, previamente à indução da NOS-2, reduz a produção de óxido nítrico pela isoforma induzida. Porém, o mesmo não foi visto pelo composto na sua forma livre. Isto mostra que uma incubação breve com a NE 7-NI manteve seu efeito inibitório sobre a NOS-1 por um período mais prolongado, a ponto de reduzir a produção de nitrito pela (provável) redução na expressão da NOS-2, em decorrência da interferência na sinalização inicial mediada pela NOS-1.

Ao final dos experimentos com cultura de células, avaliamos a viabilidade celular. Por se tratar de uma possibilidade de futuro tratamento para patologias que envolvam o aumento do NO pela NOS-1, é fundamental que a NE 7-NI não promova citotoxicidade. Verificamos, através do método de MTT (Mosmann, 1983), que a NE 7-NI, mesmo na maior concentração testada, não diminuiu a viabilidade celular de macrófago J774, nem das células musculares lisas A7r5.

As células musculares lisas vasculares expressam constitutivamente as três isoformas da NOS em condições fisiológicas, e a isoforma predominantemente expressa é a NOS-1. O NO proveniente da NOS-1 do músculo liso vascular tem papel no controle do tônus vascular, principalmente em situações em que há aumento do cálcio intracelular (Boulanger et al, 1998; Schwarz et al., 1999; Buchwalow et al., 2002). Além do sistema nervoso central, a NOS-1 é expressa em grande quantidade no sarcolema do músculo esquelético, onde atua i) mantendo a integridade muscular, através da formação de complexo com a distrofina, ii) promovendo relaxamento, iii) participando do aumento da entrega de oxigênio durante a contração (Nakane et al., 1993; Brenman et al., 1995; Copp et al., 2012).

O próximo passo foi testar a atividade da NE 7-NI *ex vivo*, visto que *in vitro* o 7-NI não apresenta seletividade entre as NOS. O ensaio foi feito utilizando sonda fluorescente DAF-FM DA que, após permear a membrana, é transformada em sua forma solúvel (DAF-FM) por esterases presentes no citosol e, quando reage com o NO forma triazol, produto estável que emite fluorescência. A sonda é bastante específica para a detecção do NO e, de maneira geral, sua detecção não depende do pH (Kojima et al., 1999; Balcerzyk et al., 2005). O principal propósito deste

experimento foi direcionar a ação da NE 7-NI sobre a NOS-1. Utilizamos aorta e músculo esquelético extensor digital longo traseiro de ratas para avaliar a inibição da produção de NO. Além de utilizarmos tecidos que expressem majoritariamente a isoforma neuronal da enzima, o protocolo foi delineado para que não houvesse influência do NO provindo da NOS-2. O protocolo experimental, desde o corte até as amostras estarem prontas para a leitura da fluorescência, não levou mais que 4 horas (30 minutos de estabilização em Hanks, 2 horas de incubação com o inibidor livre e nanoemulsionado e 1 hora de incubação com a sonda). Como a expressão da isoforma induzida leva pelo menos 12 horas, a atividade que foi medida nestes experimentos é, sem dúvida, a atividade de isoforma (s) constitutiva(s). Como a sonda DAF-FM DA detecta o NO em concentração nanomolar, não foi necessário estimular as enzimas dos tecidos. Assim, utilizamos apenas a incubação com a sonda fluorescente como controle positivo da produção do NO. Como resultado, percebemos que a intensidade de fluorescência foi inversamente proporcional à concentração da NE 7-NI. A diminuição da intensidade de fluorescência ocorreu a partir da concentração de 10 μM do inibidor e foi intensificada na maior concentração (100 μM), ou seja, houve um perfil de curva concentração-resposta. A menor concentração utilizada (1 μM) não foi capaz de diminuir a produção de NO, a não ser pela NE 7-NI no músculo esquelético. O mesmo pode ser observado com o 7-NI livre. Estes resultados mostram que a atividade inibitória do 7-NI, seja na forma livre ou na nanoemulsionada, manteve-se como dose-resposta. Isso evidencia que o fato de nanoencapsular o composto não alterou sua atividade inibitória sobre a NOS-1.

Duma e colaboradores (2011) mostraram que o pré-tratamento com 7-NI preveniu a alteração de parâmetros relacionados ao dano de órgãos e reatividade vascular, com consequente redução da mortalidade de animais endotoxêmicos e sépticos. Além disso, mostraram que o tratamento com 7-NI após a indução da endotoxemia ou sepse não produzia o mesmo efeito benéfico. Corroborando com estes resultados, Scheschowitsch e colaboradores (2015) evidenciaram que a rápida produção de NO pela NOS-1 é responsável pelo posterior aumento na expressão de NOS-2 em células musculares lisas

estimuladas com LPS. Também, Nardi e colaboradores (2014) mostraram que a NOS-1 interage com a guanilato ciclase solúvel na fase tardia da sepse, levando a hiporreatividade à vasoconstritores e que o uso de inibidores da NOS-1 melhorou este parâmetro.

Com base nestes estudos, utilizamos as NE 7-NI como pré-tratamento da sepse, a fim de comparar sua atividade à atividade do composto livre na prevenção da mortalidade de animais submetidos à sepse por CLP e por pneumonia. No modelo de sepse por CLP o 7-NI livre usado como pré-tratamento preveniu em cerca de 40% a mortalidade. O mesmo foi visto no pré-tratamento com a NE 7-NI. De maneira diferente, na pneumosepse, na qual utilizamos camundongos Swiss, o 7-NI retardou o início da mortalidade, porém não houve diferença na sobrevivência final dos animais, enquanto que as NE 7-NI retardaram o começo da mortalidade e também, melhoraram em 40% a sobrevivência.

Diferenças entre os animais e os modelos utilizados nas curvas de sobrevivência podem explicar a diferente resposta de mortalidade causada pelo 7-NI. O primeiro fator refere-se a diferenças entre as espécies animais. Segundo Zolfaghari e colaboradores (2013), camundongos têm maior taxa metabólica responsável, em grande parte, pelo controle da temperatura corporal. Já os ratos, apresentam resposta adaptativa a condições desfavoráveis, como a sepse, diminuindo seu metabolismo para conservar energia. Dessa maneira, existem diferenças nas alterações metabólicas e cardiovasculares entre as espécies durante a sepse, que podem influenciar tanto na farmacocinética do composto, quanto na velocidade de evolução da doença.

A segunda razão pode estar associada ao modelo de sepse. O modelo de CLP mimetiza a sepse polimicrobiana decorrente de perfuração por diverticulite ou ruptura do apêndice. É considerado padrão ouro no estudo da sepse, pois reproduz as fases hemodinâmica, metabólica e imunológica da sepse humana, apresentando sintomas de hipotermia, taquicardia e taquipnéia, semelhantes ao do humano séptico. Porém, a reprodutibilidade do método é de difícil alcance, pois a severidade da sepse por este modelo depende da quantidade de

conteúdo fecal extravasado e da pressão feita na ligadura, fatores manuais que variam para cada pesquisador (Buras et al., 2005; Rittirsch et al., 2008; Dejager et al., 2011). Por outro lado, a sepse humana na maioria dos casos decorre de um único patógeno. Pneumonia é uma das principais causas de sepse e os principais microrganismos causadores da disfunção são as bactérias gram-negativas, entre elas a *K. pneumoniae* (Alberti et al., 2002). Quando comparado ao CLP, o modelo de pneumosepse i) apresenta desenvolvimento de mortalidade mais lento, ii) apresenta expressão da NOS-2 mais lenta, iii) também apresenta disfunção cardiovascular, porém mais prolongada, além de iv) ter maior reprodutibilidade (Sordi et al., 2013).

Levando-se em conta os resultados com cultura celular, vimos que há uma inibição prolongada da NOS-1 pela NE 7-NI *in vitro* e que a expressão da NOS-2 é mais lenta em modelos de pneumosepse. Desta forma, a curta duração da ação do 7-NI pode não ter sido suficiente para reduzir o pulso inicial da NOS-1 pelo tempo necessário para que esta influenciasse a expressão da NOS-2. Por outro lado, a NE 7-NI conseguiu inibir a atividade da NOS-1 por maior tempo, reduzindo a expressão da NOS-2 dependente do aumento de NO da NOS-1 e o processo inflamatório. Como a expressão da NOS-2 é mais rápida no modelo de CLP, o pré-tratamento com 7-NI conseguiu inibir este *cross talk*.

Portanto, nosso trabalho sugere que o desenvolvimento de formulação nanotecnológica do tipo nanoemulsão possibilita melhora da atividade do 7-NI e pode ser uma alternativa de tratamento futuro para doenças nas quais há um desequilíbrio na produção de NO pela NOS-1.

9. PERSPECTIVAS

Os próximos passos do trabalho são: i) fazer estudo de liberação *in vitro*, ii) melhorar a estabilidade química do composto pela formulação, iii) desenvolver, a partir da formulação obtida, nanoemulsões furtivas às células fagocitárias, iv) desenvolver o estudo farmacocinético, v) testar em modelos de doenças com desequilíbrio da atividade da NOS-1.

10. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido um método para obtenção de nanoemulsão de 7-NI, um inibidor seletivo da NOS-1.
- A nanoemulsão de 7-NI feita de óleo de rícino demonstrou estabilidade físico-química no período de 15 dias, quando mantida em temperatura ambiente e na ausência de luz;
- O 7-NI é fotossensível, mesmo em formulação nanoemulsionada;
- A nanoemulsão de 7-NI inibiu de maneira parcial e prolongada a produção de NO pela NOS-2 em macrófagos J774;
- A nanoemulsão inibiu a sinalização efetuada pela NOS-1 constitutiva para a posterior expressão e atividade da NOS-2;
- A atividade da nanoemulsão 7-NI foi semelhante à do 7-NI livre sobre a inibição da produção de NO *ex vivo* em aorta e músculo esquelético;
- O pré-tratamento com a NE 7-NI preveniu em 40% a mortalidade de ratas sépticas pelo modelo de CLP;
- O pré-tratamento com a NE 7-NI preveniu em 40% a mortalidade de camundongos sépticos pelo modelo de pneumosepse.

11. REFERÊNCIAS

ALBERTI, C.; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H.; MARTIN, C.; GOODMAN, S.; ARTIGAS, A.; SICIGNANO, A.; PALAZZO, M.; MORENO, R.; BOULMÉ, R.; LEPAGE, E. LE GALL, J. R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med.**, 28: 108–121, 2002.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Lat. Am. J. Pharm.**, 27 (5): 780-8, 2008.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R.: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome and associated costs of care. **Crit Care Med.**, 29: 1303-1311, 2001.

ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates — A review. **J. Controlled Release.**, 128: 185–199, 2008.

AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; IQBAL, J.; KHAR, R. K.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. **Pharm Sci Tech.**, 10, 2009.

BABBEDGE, R. C.; BLAND-WARD, P. A.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. **Br. J. Pharmacol.**, 10: 225-228, 1993.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, 76(2): 410-20, 2010.

BAROUCH, L. A.; HARRISON, R. W.; SKAF, M. W.; ROSAS, G. O.; CAPPOLA, T. P.; KOBEISSI, Z. A.; HOBAL, I. A.; LEMMON, C. A.; BURNETT, A. L.; O'ROURKE, B.; RODRIGUEZK, E. R.; HUANG, P. L.; LIMA, J. A.; BERKOWITZ, D. E.; HARE, J. M. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature.**, 416: 337–339, 2002.

BECKMAN, J. S., KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am J Physiol.**, 271: 1424-37, 1996.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **Int. J. Pharm.**, 280: 241–251, 2004.

BOULANGER, C. M.; HEYMES, C.; BENESSIONO, J.; GESKE, R. S.; LEVY, B. I.; VANHOUTTE, P. M. Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Expressed in Rat Vascular Smooth Muscle Cells: Activation by Angiotensin II in Hypertension. **Circ Res.**, 83(12):1271-8, 1998.

BRASIL. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric Oxide, a Novel Neuronal Messenger. **Neuron.**, 8: 3-11, 1992.

BRENMAN, J. E.; CHAO, D. S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BREDT, D. S. Nitric Oxide Synthase Complexed with Dystrophin and Absent from Skeletal Muscle Sarcolemma in Duchenne Muscular Dystrophy. **Cell.**, 82: 743-752, 1995.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quim. Nova**, 35: 1827-1840, 2012.

BUCHWALOW, I. B.; PODZUWEIT, T.; BÖCKER, W.; SAMOILOVA, V. E.; THOMAS, S.; WELLNER, M.; BABA, H. A.; ROBENEK, H.; SCHNEKENBURGER, J.; LERCH, M. M. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. **FASEB J.**, 16(6): 500-8, 2002.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal Models of Sepsis: Setting the Stage. **Nat Rev Drug Discov.**, 4: 854-865, 2005.

BURNETT, A. L. Nitric Oxide in The Penis: Physiology And Pathology. **J Urol.**, 157: 320-321, 1997.

BUSH, M. A.; POLLACK, G. M. Pharmacokinetics and Protein Binding of the Selective Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole. **Biopharm. Drug Dispos.**, 21: 221–228, 2000.

CHIME, S. A.; KENECHUKWU, F. C.; ATTAMA, A. A. Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. SEZER, A. D. Application of Nanotechnology in Drug Delivery. Intech, 2014. p. 77-126.

CHO, E. J.; HOLBACK, H.; LIU, K. C.; ABOUELMAGD, S. A.; PARK, J.; YEO, Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Mol. Pharmaceutics.**, 10: 2093–2110, 2013.

CONNELLY, L., MADHANI, M., HOBBS, A.J. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out-mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. **J. Biol. Chem.**, 280: 10040–10046, 2005.

COPP, S. W.; HIRAI, D. M.; FERGUSON, S. K.; MUSCH, T. I.; POOLE, D. C. Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Modulating Microvascular and Contractile Function in Rat Skeletal Muscle. **Microcirculation.**, 18: 501–511, 2011.

DAMY, T.; RATAJCZAK, P.; SHAH, A. M.; CAMORS, E.; MARTY, I.; HASENFUSS, G.; MAROTTE, F.; SAMUEL, J.; HEYMES, C. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. **The Lancet**, 363, 2004.

DATTA, L. C. R.; JAITAWAT, B. S. S. Nanotechnology – The New Frontier of Medicine. **MJAFI.**, 62: 263-268, 2006.

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol.**, 19, 2011.

DEVALAPALLY, H.; ZHOU, F.; MCDADE, J.; GOLOVERDA, G.; OWEN, A.; HIDALGO, I. J.; SILCHENKO, S. Optimization of PEGylated nanoemulsions for improved pharmacokinetics of BCS class II compounds. **Drug Deliv.**, 1–8, 2013.

DOLL, T. A. P. F.; RAMAN, S.; DEY, R.; BURKHARD, P. Nanoscale assemblies and their biomedical applications. **J R Soc Interface.**, 10: 201-207, 2013.

DUMA, D.; FERNANDES, D.; BONINI, M. G.; STADLER, K.; MASON, R. P.; ASSREUY, J. NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. **Eur. J. Pharmacol.**, 668: 285–292, 2011.

ELIASSON, M. J. L.; HUANG, Z.; FERRANTE, R. J.; SASAMATA, M.; MOLLIVER, M. E.; SNYDER, S. H.; MOSKOWITZ, M. A. Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation and Peroxynitrite Formation in Ischemic Stroke Linked to Neural Damage. **J Neurosci.**, 19(14): 5910–5918, 1999.

EVANS, T.; CARPENTER, A.; KINDERMAN, H.; COHEN J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circ Shock.**, 41(2): 77-81, 1993.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Parte I. São Paulo: ATHENEU, 2010.

FAST, J. P.; MECOZZI, S. Nanoemulsions for Intravenous Drug Delivery. VILLIERS, M. M.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. Nanotechnology in Drug Delivery. Springer Science & Business Media, New York, USA, 2009. p. 461-489.

FURCHGOTT R F, ZAWADZKI J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, 288: 373-376, 1980.

GANTA, S.; TALEKAR, M.; SINGH, A.; COLEMAN, T. P.; AMIJI, M. M. Nanoemulsions in Translational Research—Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. **Pharm Sci Tech.**, 15, 2014.

GATTO, E. M.; RIOBO, N. A.; CARRERAS, M. C.; CHERNAVSKY, A.; RUBIO, A.; SATZ, M. L.; PODEROSO, J. J. Overexpression of Neutrophil Neuronal Nitric Oxide Synthase in Parkinson's Disease. **Nitric Oxide-Biol Ch.**, 4: 534–539, 2000.

GOCAN, N.C., SCOTT, J.A., TYML, K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Heart Circ.**, 278: 1480–1489, 2000.

GOTTI, S.; SICA, M.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. Distribution of Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in the Mouse Brain. **Microsc Res Tech.**, 68: 13–35, 2005.

GOVERS, R.; OESS, S. To NO or not to NO: 'where?' is the question. **Histol Histopathol.**, 19: 585-605, 2004.

GREENWOOD, R. Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. **Adv. Colloid Interface Sci.**, 106: 55-81, 2003.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNˆOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol.**, 76: 126–152, 2005.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**., 24: 4283–4300, 2003.

HOLLENBERG, S. M.; BROUSSARD, M.; OSMAN, J.; PARRILLO, J. E. Increased Microvascular Reactivity and Improved Mortality in Septic Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. **Circ. Res.**, 86: 774-779, 2000.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech.**, 5: 123–127, 2015.

JANSSEN, E. M. L.; MARRON, E.; MCNEILL, K. Aquatic photochemical kinetics of benzotriazole and structurally related compounds. **Environ. Sci.: Processes Impacts**., 17(5): 939-46, 2015.

KECK, C. M.; JANSCH, M.; MÜLLER, R. H. Protein Adsorption Patterns and Analysis on IV Nanoemulsions—The Key Factor Determining the Organ Distribution. **Pharmaceutics**., 5: 36-68, 2013.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsion as colloidal drug carries for intravenous administration. In: (Ed.). Submicron emulsions in drug targeting and delivery Harwood academic publishers, 1998. p.119-146.

KLATT, P.; SCHMID, M.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; WERNER, E. R.; MAYER, B. The Pteridine Binding Site of Brain Nitric Oxide Synthase. **J Biol Chem**. 269(19): 13861-6, 1994.

KOJIMA, H.; URANO, Y.; KIKUCHI, K.; HIGUCHI, T.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Fluorescent indicators for Imaging Nitric Oxide. **Angew Chem Int Ed.**, 38: 3209-3212, 1999.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomed Nanotech Biol Med.**, 1: 193–212, 2005.

LAMMERS, T.; AIME, S.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; KIESSLING, F. Theranostic Nanomedicine. **Acc. Chem. Res.**, 1029–1038, 2011.

LOPEZ-SERRANO, A.; OLIVAS, R. M.; LANDALUZE, J. S.; CAMARA, C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. **Anal. Methods.**, 6: 38–56, 2014.

LOVELYN, C; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **J Biomater Nanobiotechnol.**, 2: 626-639, 2011.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Rev. Eletrônica Farm.**, 2: 01-37, 2009.

MARTIN, G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, 10(6): 701–706, 2012.

MAYER, B.; JOHN, M.; BÖHME, E. Purification of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. **FEBS Lett.**, 277(1-2):215-9, 1990.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Front. Immunol.**, 5: 458, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, 8:17-19, 2012.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain.**, 52: 127-136, 1993.

MELLION, B. T.; IGNARRO, L. J.; OHLSTEIN, E. H.; PONTECORVO, E. G.; HYMAN, A. L.; KADOWITZ, P. J. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood.**, 57(5): 946-55, 1981.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacol Rev.**, 43(2):109-42, 1991.

MOORE, P. K.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.; HART, S. L.; BABBEDGE, R. C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 219-224, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, 65: 55-63, 1983.

MULLER, R. H.; HEINEMANN, S. Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. **Clin Nutr.**, 11: 223-23, 1992.

NAKANE, M.; SCHMIDTB, H. H. H. W.; POLLOCK, J. S.; FÖRSTERMANN, U.; MURADA, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Lett.** 316(2): 175-80, 1993.

NARDI, G. M.; SCHESCHOWITSCH, K.; AMMAR, D.; OLIVEIRA, S. K.; ARRUDA, T. B.; ASSREUY, J. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Its Interaction With Soluble Guanylate Cyclase Is a

Key Factor for the Vascular Dysfunction of Experimental Sepsis. **Crit Care Med.**, 42(6): 391-400, 2014.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Mol Aspects Med.**, 26: 33–65, 2005.

NATHAN, C. F.; HIBBS JR, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol.**, 365-70, 1991.

ODRIOZOLA-SERRANO, I.; OMS-OLIU, G.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. **Front Nutr.**, 24, 2014.

O'NEILL, M. J.; HICKS, C.; WARD, M. Neuroprotective effects of 7-nitroindazole in the gerbil model of global cerebral ischaemia. **Eur. J. Pharmacol.**, 310: 115-122, 1996, 115–122.

PRAKASH, R. T.; THIAGARAJAN, P. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. **Res J Biotechnol.**, 2(3):01-13, 2011.

PRATTEN, M. K.; LLOYD, J. B. Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. **Biochim Biophys Acta.**, 881: 307-313, 1986.

RANDRIAMBOAVONJY, V.; FLEMING, I. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? **Pharmacol Rep.**, 57, 2005.

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. **JAMA.**, 273: 117-123, 1995.

RIEFLER, G. M.; FIRESTEIN, B. L. Binding of Neuronal Nitric-oxide Synthase (nNOS) to Carboxyl-terminal-binding Protein

(CtBP) Changes the Localization of CtBP from the Nucleus to the Cytosol. **J. Biol. Chem.**, 276: 48262–48268, 2001.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols.**, 4, 2009.

ROSSI, J.; LEROUX, J. C. Principles in the Development of Intravenous Lipid Emulsions. WASAN, K. W. Role of Lipid Excipients in Modifying Oral and Parenteral Drug Delivery. University of British Columbia, Vancouver, British Columbia. John Wiley & Sons Inc, 2007. p. 88-98.

SAHOO, S. K. & LABHASETWAR. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, 8(24):1112-20, 2003.

SANTANA-SOLANO, J.; QUEZADA, C.M.; OZUNA-CHACÓN, S.; ARAUZ-LARA, J. L. Spontaneous emulsification at the water/oil interface. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.**, 399: 78– 82, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Quim. Nova.**, 26: 726-737, 2003.

SCHWARZ, P. M.; KLEINERT, H.; FÖRSTERMANN, U. Potential Functional Significance of Brain-Type and Muscle-Type Nitric Oxide Synthase I Expressed in Adventitia and Media of Rat Aorta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 1999.

SHAFIQ, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; ALI, M. Development and bioavailability assessment of Ramipril nanoemulsion formulation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 66(2): 227-243, 2007.

SCHESCHOWITSCH, K.; MORAES, J. A.; SORDI, R.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Rapid NOS-1-derived nitric oxide

and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Res.**, 100: 73–84, 2015.

SHI, J.; VOTRUBA, A.R.; FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano Lett.**, 10: 3223–3230, 2010.

SHINODA, K.; SAITO, H. The stability of o/w type emulsions as a function of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by pit-method. **J.Colloid Interface Sci.**, 30: 258–263, 1969.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A. C. B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L. O.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G. R.; SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; ANDRADE, J.; MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C. S.; MATOS, G. F. J.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C. B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care Med.**, 8, 2004.

SORDI, R.; MENEZES-DE-LIMA, O.; DELLA-JUSTINA, A. M.; REZENDE, E.; ASSREUY, J. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **Int. J. Exp. Path.**, 94: 144–155, 2013.

STAMLER, J. S.; LOH, E.; RODDY, M.; CURRIE, K. E.; CREAGER, M. A. Nitric Oxide Regulates Basal Systemic and Pulmonary Vascular Resistance in Healthy Humans. **Circulation.**, 89, 1994.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D. I.; KEANEY, J.; VITA, J.; SINGEL, D.; VALERI, C. R.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 89: 7674-7677, 1992.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.**, 75: 107-163, 1998.

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta.**, 1411: 437-455, 1999.

VO, P.A., LAD, B., TOMLINSON, J.A., FRANCIS, S., AHLUWALIA, A. Autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. **J. Biol. Chem.**, 280: 7236–7243, 2005.

XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Soybean-based Surfactants and Their Applications. 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/soybeanapplications-and-technology/soybeanbased-surfactants-and-their-applications>>.

WINK, D. A.; Vodovotz, Y.; Laval, J.; Laval, F.; Dewhirst, M. W.; Mitchell, J. B. The multifaceted roles of nitric oxide in câncer. **Carcinogenesis.**, 19: 711–721, 1998.

WOLFF, D. J.; GRIBIN, B. J. The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. **Arch Biochem Biophys.**, 314(2): 360-6, 1994.

WU, W. Parenteral Nanoemulsions –Composition, Preparation and Cellular Uptake. 2007. Tese para a obtenção do doutorado da Faculdade de Química, Farmácia e Ciências da Terra, Universidade Albert -Ludwig de Freiburg, Taipei, Taiwan, 2007.

YU, W.; XIE, H. A Review on Nanofluids: Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. **J Nanomater.**, 2012.

YUSTE, J. E.; ECHEVERRY, M. B.; ROS-BERNAL, F.; GOMEZ, A.; ROS, C. M.; CAMPUZANO, C. M.; FERNANDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat

model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology.**, 63: 1258–1267, 2012.

ZOLFAGHARI, P. S.; PINTO, B. B.; DYSON, A.; SINGER, M. The metabolic phenotype of rodent sepsis: cause for concern? **Intensive Care Med Exp.**, 1:6, 2013.

ZHOU, L.; ZHU, D. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide.**, 20: 223–230, 2009.